IDENTIFIZIERUNG NINHYDRINPOSITIVER SUBSTANZEN AUS ABWASSER

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Detlef Bimboes
aus Holzminden

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523714_0036

IDENTIFIZIERUNG NINHYDRINPOSITIVER SUBSTANZEN AUS ABWASSER

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Detlef Bimboes
aus Holzminden

1978

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Januar 1978

Dekan:	Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Oktober 1975 bis November 1977 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. Ernst Bayer,
danke ich für seine großzügige Unterstützung, eine große Zahl von Anregungen und das stete Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Herrn Dr. Hartmut Frank danke ich für viele wertvolle Hinweise bei den Analysen mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie.

Der Friedrich-Ebert-Stiftung danke ich für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums.

MEINEN ELTERN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Verzeichnis der Abkürzungen

BSTFA = N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid

GC/MS = Gaschromatographie/Massenspektrometrie

PFP = Pentafluorpropionsäure, Pentafluorpropionyl-

RSA = Rinderserumalbumin

TFA = Trifluoressigsäure, Trifluoracetyl-

TMSi = Trimethylsilyl-

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG + PROBLEMSTELLUNG	1
2.	ALLGEMEINER TEIL	3
2.1.	Ninhydrinpositive Substanzen	3
2.1.1.	Zur Klassifizierung ninhydrinpositiver Substanzen	4
2.1.2.	Reaktionen stickstoffreier Substanzen mit Ninhydrin am Beispiel der Lävulinsäure	6
2.2.	Reaktionen zwischen Zuckern und Aminosäuren unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse	7
2.3.	Charakterisierung der Tagessammelprobe	13
2.3.1.	Aminosäureanalyse	15
2.3.2.	Zuckeranalyse	16
2.4.	Modellhydrolysen zwischen Zuckern und Rinderserumalbumin	20
2.5.	Charakterisierung der ninhydrinpositiven Substanzen	26
2.5.1.	Substanz S 1	26
2.5.2.	Substanz S 2	29
2.5.3.	Substanz S 3 und S 4	36
2.5.4.	Substanz S 5	42
2.5.5.	Substanz S 6 und S 7	54
3.	EXPERIMENTELLER TEIL	61
3.1.	Geräte und Materialien	61
3.2.	Chemikalien	62
3.3.	Lösungsmittel und Reagenzien	62
3.4.	Arbeitsmethoden	63
3.4.1.	Aufarbeitung der Tagessammelprobe	63
3.4.2.	Bestimmung des Gesamtaminosäuregehalts	64

3.4.3.	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts	64
3.4.4.	Durchführung der sauren Hydrolyse und Aufarbeitung des Hydrolysats	64
3.4.5.	Hydrolyse der Kohlenhydrate	65
3.5.	Isolierung der ninhydrinpositiven Substanzen am Kationenaustauscher	66
3.5.1.	Aufbau des Chromatographen	66
3.5.2.	Durchführung der Trennungen	67
3.5.2.1.	Puffer und Standardlösungen	67
3.5.2.2.	Säulenvorbereitung	67
3.5.2.3.	Probenvorbereitung	68
3.5.2.4.	Analytische Trennung	69
3.5.2.5.	Präparative Trennung	69
3.6.	Zur Klassifizierung der isolierten Substanzen	70
3.7.	Derivatisierung und Gaschromatographie der ninhydrinpositiven Substanzen S 1 - S 5	71
3.7.1.	Derivatisierung von S 1	71
3.7.2.	Derivatisierung von S 2, Uron- und Onsäuren	71
3.7.3.	Derivatisierung von S 3, S 4 und S 5	71
3.7.4.	Derivatisierung von Glucosamin und Galactosamin	71
3.7.5.	Derivatisierung von Verunreinigungen aus Säulenmaterial	72
3.7.6.	Gaschromatographie	72
3.8.	Derivatisierung von S 6, S 7 und Aminen	73
4.	ZUSAMMENFASSUNG	
5.	LITERATURVERZEICHNIS	76

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Zur Untersuchung bestehender Probleme bei der biologischen Reinigung brauereibelasteter Abwässer wurden am Zulauf der Kläranlage Eutingen/Horb Abwasserproben entnommen (1). Nach dem Sterilfiltrieren der Proben wurden alle niedermolekularen anorganischen und organischen Substanzen bis zum Molekulargewicht 1 000 durch Ultrafiltration entfernt.

Die ultrafiltrierten Proben stellten somit im wesentlichen ein Substanzgemisch aus Peptiden, Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und wasserlöslichen Huminanteilen dar. Sie werden im folgenden kurz als Tagessammelproben bezeichnet.

Diese wurden nach Gefriertrocknung und saurer Hydrolyse im Aminosäureanalysator auf ihre Aminosäurezusammensetzung hin untersucht. Dabei wurden immer wieder nicht näher untersuchte ninhydrinpositive Substanzen neben den üblich vorkommenden Aminosäuren gefunden (1). Es war daher von Interesse, deren Struktur zu ermitteln.

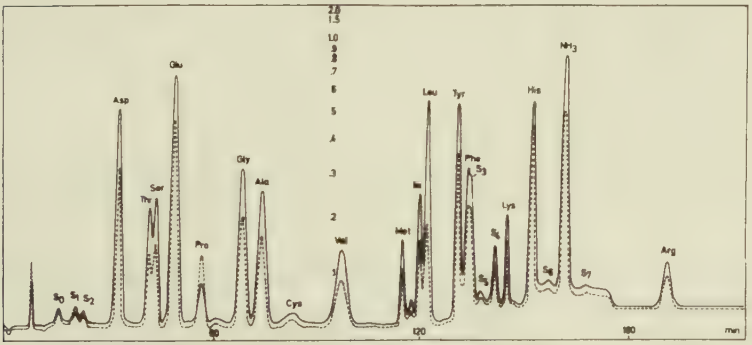


Abb. 1: Typisches Aminosäurediagramm des Hydrolysats einer Tagessammelprobe mit den unbekannten ninhydrinpositiven Substanzen. 1500 µmol Gesamtaminosäuren. Experimentelle Bedingungen siehe 2.3.1.

Aminosäureanalysen der Kläranlagen Stuttgart-Büsnau und Kirchentellinsfurt zeigen, daß die Substanzen nicht nur auf den Zulauf der Kläranlage in Eutingen beschränkt sind (Scheer, unveröffentlicht). Allgemein ist das Auftreten unbekannter ninhydrinpositiver Substanzen bei Aminosäureanalysen vieler Gewässerproben beobachtet worden (2), unter anderem bei der Analyse von Huminsäuren aus Abwasser (3). Darüberhinaus wurden sie bei der Analyse von Nahrungsmitteln, Getreide (4), Bodenhuminsäuren (5) und Peptidglukanen mikrobiellen Ursprungs gefunden (6).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die Isolierung und Identifizierung der ninhydrinpositiven Substanzen aus Tagessammelproben des Zulaufs der Kläranlage Eutingen/Horb.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Ninhydrinpositive Substanzen

Ninhydrin wird allgemein zum Nachweis von Aminosäuren verwendet. Es reagiert aber auch mit vielen primären Aminen und Aminozuckern. Purin- und Pyrimidinbasen können jedoch nicht über die Ninhydrinreaktion nachgewiesen werden.

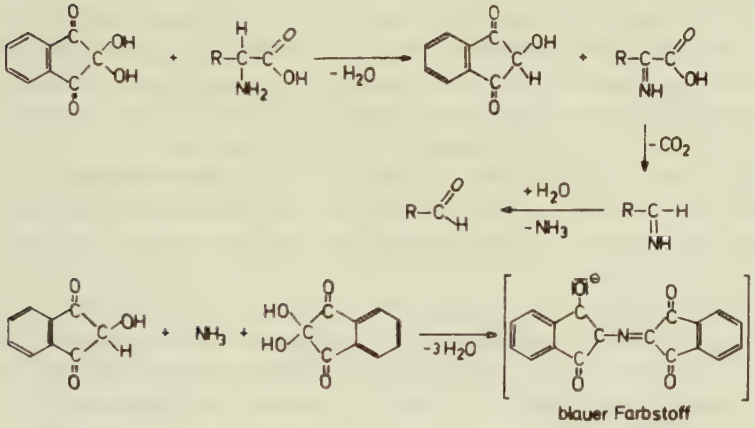


Abb. 2: Reaktionsmechanismus von Ninhydrin mit Aminosäuren (nach Prof. Dr. E. Bayer)

Bei der Analyse von Nahrungsmitteln und Pflanzeninhaltsstoffen sind eine ganze Reihe ninhydrinpositiver Substanzen gefunden worden. Sie erwiesen sich sehr oft als stickstoffhaltige Intermediärprodukte des Stoffwechsels, wie Citrullin, Kreatin, Glutathion. Einen umfassenden Überblick dazu gibt die Arbeit von Zacharius und Talley (7).

Offensichtlich kann Ninhydrin aber auch mit Substanzen unter Ausbildung eines Farbstoffs reagieren, die keine Aminogruppen enthalten.
So beobachteten Schramm et al. bereits 1953 (8) bei der Aufarbeitung verunreinigter Proteinhydrolysate über die Ionenaustauschchromatographie im Bereich der ersten Fraktionen einen unbekannten ninhydrinpositiven Peak.
Sie zeigten, daß dieser Peak unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse nur in Gegenwart von Kohlenhydraten auftritt.
Dies konnten auch Zacharius et al. 1962 (4) bei ihren Untersuchungen am Aminosäureanalysator bestätigen. Die Aminosäureanalyse verunreinigter Proteinhydrolysate von Nierenbohnensamen zeigte neben den üblichen Aminosäurepeaks noch eine gewisse Anzahl kleinerer Peaks.
Glucose zeigte bei der sauren Hydrolyse unter den gleichen Bedingungen im Aminosäureanalysator genau dieselbe Anzahl kleinerer Peaks. Der größte Peak wies zudem eine auffallende Absorption im Bereich von 440 nm auf. Das war bisher nur von Prolin bekannt.
Unabhängig voneinander konnten Zacharius et al. (4) und Schilling et al. (9) beweisen, daß es sich bei diesem Peak um Lävulinsäure handelt. Sie tritt unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse stets als Abbauprodukt der Hexosen und 6-Desoxyzucker auf.

2.1.1. Zur Klassifizierung ninhydrinpositiver Substanzen

In der Folgezeit fanden Schilling et al. (10) noch eine ganze Reihe stickstoffreier wasserlöslicher Substanzen, die mit Ninhydrin positiv reagieren können.
Tabelle 1 gibt dazu einen Überblick (10).

Substanz	Probe-vol. (µMol)	Elutions-zeit (min)	Peakfläche (HxW)[1]
Prolin (Referenz)	1	366	3,9
Lävulinsäure	50	155	10,8
Lävulinsäuremethylester	50	171	2,0
Brenztraubensäure	125	97	1,3
α-Ketobuttersäure	202	98	0,18
α-Ketovaleriansäure	508	132	0,02
α-Ketoglutarsäure	50	100	14,5
Oxalessigsäure	100	102	5,1
Phenylbrenztraubensäure	610	115	5,7
p-Hydroxyphenylbrenztrauben-säure	609	108	6,1
Äthylenacetoacetat	205	169	8,2
γ-Ketopimelinsäure	100	160	98,7
Acetoin	335	148	17,4
Dihydroxyaceton	98	169	15,2
γ-Valerolaceton	267	151	1,13
Glucuronlacton	50	142	3,9
D,L-Glycerinaldehyd	50	132	5,8
Fructose	222	124	2,2
Ascorbinsäure	113	130	28,5
5-Ketogluconsäure	125	112	29,0

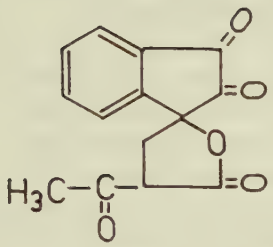
[1] H x W = Nettohöhe des Peaks x Peakbreite (13)

Tab. 1: Verhalten einiger stickstoffreier Substanzen im Aminosäureanalysator (Modell K 5000 der Firma Phoenix Precisions Instruments, USA)

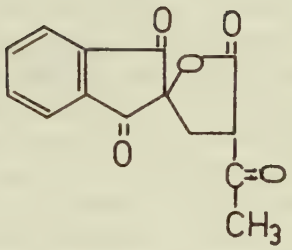
Diese wasserlöslichen Substanzen lassen sich den folgenden vier Verbindungsklassen zuordnen: Hydroxysäuren, Ketosäuren, Hydroxyaldehyde und Hydroxyketone.
Zacharius und Porter (11) konnten bei Versuchen an einer für Aminosäuretrennungen verwendeten Amberlite IR-120 Säule zeigen, daß selbst Zucker wie Glucose, Galactose, Ribose und Arabinose in geringem Umfang mit Ninhydrin reagieren können. Unter diesen Bedingungen reagiert sogar Hydroxymethylfurfural mit Ninhydrin. Dies war zuvor von Schilling et al. (8) aufgrund von Reagenzglasversuchen nicht vermutet worden.
Olson et al. (12) stellten zudem bei Untersuchungen im Aminosäureanalysator fest, daß auch Glucuron- und Galacturonsäure ninhydrinpositive Substanzen sind. Ihre unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse gebildeten Abbauprodukte geben ebenfalls Peaks vor Asparaginsäure im Aminosäureanalysator. Dies allerdings nur in Gegenwartvon Ninhydrin.

2.1.2. Reaktionen stickstoffreier Substanzen mit Ninhydrin am Beispiel der Lävulinsäure

An stickstoffreien Substanzen ist bis jetzt lediglich Lävulinsäure auf ihre Reaktionsprodukte bei der Umsetzung mit Ninhydrin untersucht worden (9).
Bei Modellversuchen zur Reaktivität zwischen Ninhydrin und Lävulinsäure konnte ein farbloses Reaktionsprodukt durch Ätherextraktion und schrittweise Gradientenelution mit Cellulose-Chloroform an Celite 545 isoliert werden. Untersuchungen mittels der Infrarotspektroskopie, NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie zeigten, daß Lävulinsäure über einen Lactonring mit Ninhydrin verbunden ist. Über den eigentlichen Reaktionsmechanismus ist nichts bekannt.
Abbildung 3 zeigt die beiden möglichen Strukturformeln.



I



II

Abb. 3: Vorgeschlagene Strukturformeln für das farblose Reaktionsprodukt von Ninhydrin mit Lävulinsäure

2.2. Reaktionen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse

Die Hydrolysate der Tagessammelproben waren stets gelblich-braun gefärbt. Zudem war ein beträchtlicher Anteil schwarzen, nicht löslichen Materials zu beobachten.
Bei der Analyse von Glykoproteinen wurde dasselbe beobachtet (14). Offensichtlich ist das auf Reaktionen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen zurückzuführen.

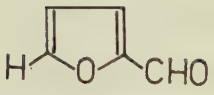
Die Maillard-Reaktion:

Maillard beschrieb erstmals 1912 (15) die Bildung schwarzbrauner Substanzen, wenn ein Mono- oder Disaccharid zusammen mit einer Aminosäure in wässriger Lösung erhitzt wurde. Allerdings erwiesen sich nur reduzierte Zucker als reaktiv.

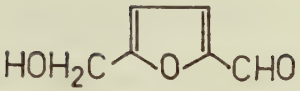
Die Maillard-Reaktion ist ein sehr komplexer Vorgang. Er schließt eine ganze Reihe chemischer Reaktionen ein. Letztlich führen sie zu den gelblich-bräunlichen Substanzen, die auch als Melanoidine oder huminähnliche Substanzen bezeichnet werden. Der Verlauf der Reaktion variiert mit pH, Temperatur und Feuchtigkeit.
Einleitender Schritt der Maillard-Reaktion ist die Bildung eines N-substituierten Glycosylamins. Hierbei reagiert die nichtprotonierte Aminogruppe einer Aminosäure unter leicht sauren Bedingungen mit der protonierten Aldehydgruppe des offenkettigen Zuckers. Der größte Anteil der N-substituierten Aldosylamine unterliegt der Isomerisierung zu N-substituierten 1-Amino-1-Desoxy-2-Ketozuckern durch die Amadori-Umlagerung (16).
Die Aldosylamine sind unbeständig. Bei saurer Hydrolyse zerfallen sie leicht in die Ausgangsverbindungen. Bei Einwirkung von Feuchtigkeit zersetzen sie sich teilweise unter Bildung eines schwarzbraunen Niederschlags (16). Daraus konnten Hodge und Rist (17) das Amadori-Produkt in 30% Ausbeute isolieren.

Abbau von Kohlenhydraten unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse:

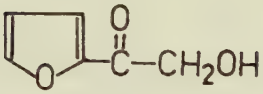
Unter den extremen Bedingungen der sauren Hydrolyse (6 N HCl für 24 Stunden bei 110° C) ist die Neigung zur Bildung von Glycosylaminen zwischen Zuckern und Aminosäuren sehr gering. Stattdessen werden Pentosen und Uronsäuren überwiegend zu 2-Furaldehyd (Furfural) abgebaut, Hexosen und 6-Desoxyzucker hauptsächlich zu 5-Hydroxymethyl-2-Furaldehyd (HMF) (18). Beim Abbau von Fructose entsteht in geringem Umfang auch 2-(2-Hydroxyacetyl)furan.



Furfural



5-Hydroxymethyl-
2-furfural



2-(2-Hydroxyacetyl)furan

Abb. 4: Abbauprodukt von Glucose und Fructose

Nach Shaw et al (19) deutet dies auf eine einleitende Enolisierung an den C-atomen 2 und 3 hin. Anschließend erfolgt die Eliminierung von Wasser.
Abb. 5 zeigt den Abbau von Glucose und Fructose.

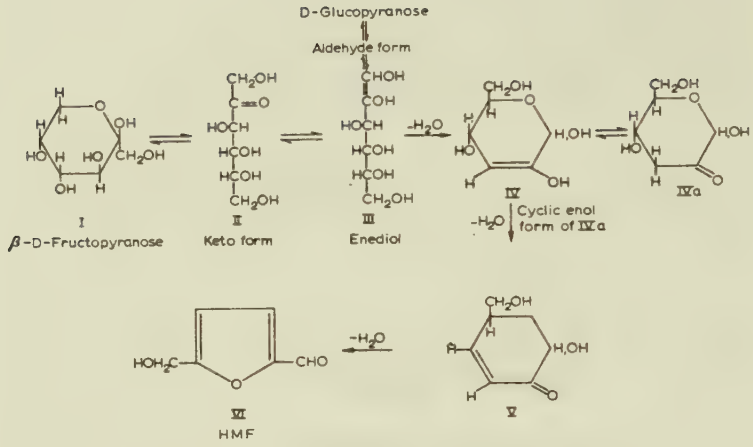


Abb. 5: Reaktionsmechanismus des Abbaus von D-Glucose und D-Fructose zu 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyd (HMF). IVa, 3-Desoxy-D-erythro-hexulose (2), (1,5-Pyranose Form); V, 3,4-Didesoxy-D.glycero-hexosulose-cis-3-en(1,5-Pyranose Form) (16).

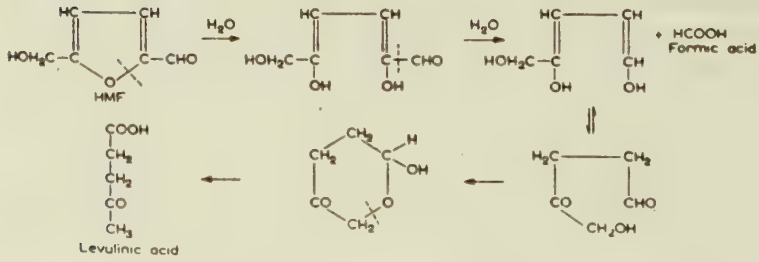
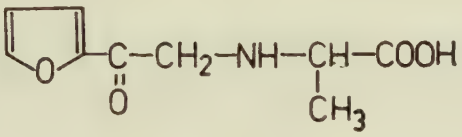


Abb. 6: Abbau von 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyd zu Lävulinsäure und Ameisensäure (16).

Wie aus Abb. 6 hervorgeht, wird 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyd bis zur Lävulinsäure abgebaut. Daneben entsteht noch Ameisensäure.
Die bei der sauren Hydrolyse gebildeten Abbauprodukte 3-Desoxy-hexulose und HMF können dann ebenfalls mit Aminosäuren unter den milden Reaktionsbedingungen der Maillard-Reaktion reagieren. So erhielten Heyns et al. (20) bei der Umsetzung von Fructose und Alanin (1 Stunde bei 90° C in 6 N HCl) neben HMF auch
1 N-(2-furoylmethyl)alanin.



Bei der Umsetzung von 1-DL-Phenylalanin-1-Desoxy-D-Fructose in 2 N Essigsäure bei 100° C für 2 Stunden wird in großem Umfang HMF gebildet. Der Abbau des Zuckeranteils setzte das Phenylalanin frei. Die Reaktion war von der Bildung schwarzbraunen Materials begleitet. Unter den gleichen Bedingungen bildete Fructose keine merklichen Mengen an HMF (21).

Reaktionen zwischen Dicarbonylverbindungen und Aminosäuren

Anet (22) konnte zeigen, daß die Maillard-Reaktion zwischen D-Glucose und Glycin bei pH 5 eine relativ geringe Ausbeute an Di-D-fructose-glycin ergibt. Die hohe Umsatzrate verursacht jedoch die Bildung beträchtlicher Mengen an Dicarbonylverbindungen. Diese reagieren mit Aminosäuren zu dunkel gefärbten Verbindungen.
Besonders Schönberg und Moubacher (23) konnten zeigen, daß viele Ketone Aminosäuren nach dem Strecker-Mechanismus abbauen (siehe Abb. 7).

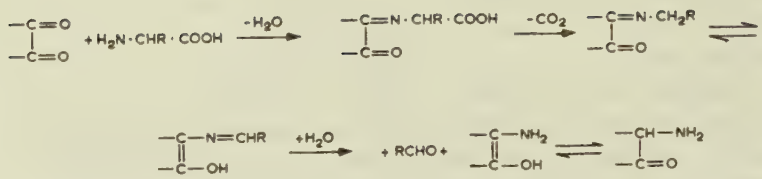


Abb. 7: Strecker-Abbau von Aminosäuren durch Dicarbonylverbindungen

Dies gilt für viele α-Ketonsäuren, α-Ketolactone, α-Ketoaldehyde und 1,2-Diketone. Voraussetzung ist allerdings eine $-CO-(-C=C)_n-CO$ Gruppierung (n = 0,1,2...).

Die beim Strecker-Abbau entstehenden Aminoketone können untereinander Kondensationsreaktionen eingehen. Dadurch bilden sich schwarzbraune Substanzen (24).
Einige der beim Strecker-Abbau gebildeten Aldehyde können ebenfalls mit Aminosäuren unter Bildung bräunlicher Substanzen reagieren. Das gilt ganz besonders für Acetaldehyd. Nicht oder kaum reagieren Formaldehyd und Propionaldehyd (25).

Besonders rasch verläuft die Bräunung und die Bildung huminartigen Materials, wenn die Carbonylgruppe in konjugierter Stellung zu einer C=C Doppelbindung liegt (25). So reagiert Crotonaldehyd sehr schnell mit Aminosäuren unter Bildung braunschwarzen Materials. Hiermit wird deutlich, warum Hydroxymethylfurfural als α,ß-ungesättigte Carbonylverbindung rasch mit Aminosäuren huminartige Substanzen bildet.

Die im Verlauf der Maillard-Reaktion stattfindenen Umsetzungen zur Bildung bräunlich-gelber Farbstoffe und huminartiger Produkte sind noch unbekannt. Die anfangs durch Reaktion von Aminosäuren mit α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen gebildeten Substanzen können Sekundärreaktionen eingehen, einschließlich Kondensation, Cyclisierung und

Polymerisation. Aus den Reaktionsprodukten können auf jeden Fall weder Aminosäuren noch Zucker isoliert werden.
Generell muß jedoch ein Unterschied zwischen Huminen natürlichen und künstlichen Ursprungs bestehen.
So lassen sich die auf biochemischem Wege entstandenen Humine sicherlich nicht mit denen unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse (siehe 3.4.4.) gebildeten vergleichen (3).

2.3. Charakterisierung der Tagessammelprobe

1. Gesamtausbeute

Nach dem Abfiltrieren der Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 mit einer Amicon UM 2 Ultrafiltrationsmembran wurde eine Ausbeute von 650 mg Substanz/20 l Abwasser erhalten.

2. Elementaranalyse [1)]

Element	C	H	N	O	S
Anteil in %	42,5	5,6	5,8	46,1	0

Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert zweier Elementaranalysen.

3. Bestimmung des Gesamtaminosäuregehalts

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach 3.4.2.. Grundlage bildet die Ninhydrinreaktion. Der Aminosäuregehalt der Tagessammelprobe (TSP) wird über eine Isoleucin-Eichkurve bei 570 nm bestimmt.

---

1) Für die Durchführung der Elementaranalysen danke ich Herrn Wurmstich.

Ile (µg)	10	25	50	TSP	Extinktion (Mittelwert)
$E_{570\ nm}$	0.01	0,05	0,14	0,03 0,04	0,035

Zum Versuch wurden 100 µg Tagessammelprobe/Ansatz eingesetzt. Diese enthalten somit 17,5 µg Gesamtaminosäuren.

Ergebnis: 17,5 mg Gesamtaminosäuregehalt/100 mg Tagessammelprobe.

4. Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach 3.4.3.
Grundlage bildet die Anthron-Reaktion. Der Kohlenhydratgehalt wurde über eine Glucose-Eichkurve bei 625 nm bestimmt.

Glucose (µg)	10	25	50	TSP	Extinktion (Mittelwert)
$E_{625\ nm}$	0,07	0,13	0,25	0,07 0,07	0,07

Zum Versuch wurden 100 µg Tagessammelprobe/Ansatz eingesetzt. Diese enthalten damit 10 µg Gesamtkohlenhydrate.

Ergebnis: 10 mg Gesamtkohlenhydratgehalt/100 mg Tagessammelprobe.

2.3.1. Aminosäureanalyse

Zur Durchführung der Untersuchungen diente ein Multichrom-B-Flüssigkeitssäulenchromatograph der Firma "Beckman-Instruments", München. Die Trennung der Aminosäuren erfolgt nach dem Einsäulenverfahren von Spackman, Stein und Moore (13).

Die Abmessungen der Säule betragen 60 x 0,9 cm. Das Säulenfüllmaterial besteht aus einem stark sauren Kationenaustauscher mit Sulfonsäuregruppen an einem Polystyrolharz. Er besitzt einen Vernetzungsgrad von 7% und eine Korngröße von 15-20 µm (Kationenaustauscher M 72, Beckman-Instruments, München). Zur Elution der sauren, neutralen und basischen Aminosäuren wird Citratpuffer der pH Bereiche 3,2; 4,3 und 6,3 verwendet.

Pufferdurchfluß: 50 ml/h
Ninhydrindurchfluß: 25 ml/h
Temperatur des Säulenmantels: 55° C

10 mg Tagessammelprobe wurden unter sauren Bedingungen hydrolysiert und aufgearbeitet (siehe 3.4.4.).
Das Hydrolysat wurde in Citratpuffer pH 3,2 aufgenommen und 0,5 ml mit 1500 nmol Gesamtaminosäuregehalt zur Trennung auf die Säule aufgetragen.
Abb. 9 zeigt ein Chromatogramm, auf dem neben den bekannten Aminosäuren acht bisher nicht näher untersuchte ninhydrinpositive Substanzen zu finden sind. Von ihnen sind nur geringe Anteile vorhanden.

2.3.2. Zuckeranalyse

Gerade im Hinblick auf die Modellhydrolysen zwischen Zuckern und Rinderserumalbumin sollte die Zuckerzusammensetzung der Tagessammelprobe möglichst genau ermittelt werden.
Hierzu wurde diese mit Trifluoressigsäure unter den in 3.4.5. angegebenen Bedingungen hydrolysiert und aufgearbeitet. Das Hydrolysat wurde anschließend im Zuckeranalysator aufgetrennt. Der Anteil der einzelnen Zucker wird über ein Testchromatogramm errechnet. Die Messung erfolgt bei 440 nm.

Die Auswertung zeigt neben Glucose auch größere Anteile von Xylose und Arabinose. Das weist auf einen heterogenen Polysaccharidanteil hin. Neben glucosehaltigen Polysacchariden finden sich Xylane und Arabane. Rhamnose ist Bestandteil vieler Glykoside.

Berechnung des Anteils der einzelnen Zucker an der Tagessammelprobe

Hierzu wird ein Testchromatogramm verwendet. Die Peakfläche jedes einzelnen Zuckers entspricht 50 nmol.
Sie berechnet sich nach:

$$\text{Peakfläche (in mm}^2\text{)} = \text{Höhe} \times \text{Breite in halber Höhe}$$

Für jeden Zucker werden mit Hilfe eines Testgemisches die entsprechenden Eichfaktoren bestimmt. Diese dienen der genauen Berechnung der Konzentrationen der jeweiligen Zucker in der Tagessammelprobe.

Tab. 2: Testchromatogramm

Zucker	Fläche (in mm^2)	Eichfaktor (mm^2/nmol)	
Glucose	325	6,50	Einspritz-
Xylose	228	4,56	volumen:
Galactose	112	2,24	50 nmol Zucker/500 µl
Arabinose	186	3,72	0,4 M Boratpuffer
Fructose	186	3,72	pH 9,3
Mannose	163	3,23	
Ribose	--	--	
Rhamnose	112	2,24	

Tab. 3: Chromatogramm der Tagessammelprobe

Zucker	Fläche (in mm^2)	
Glucose	725	Einspritzvolumen:
Xylose	150	1 mg Hydrolysat/500 µl
Galactose	236	0,4 M Boratpuffer pH 9,3
Arabinose	186	
Fructose	203	
Mannose	206	
Ribose	--	
Rhamnose	234	

Tab. 4: Anteil der Einzelzucker an der Tagessammelprobe

Zucker	nmol/mg TSP	mg Zucker/100 mg TSP
Glucose	113	2
Xylose	33	0,5
Galactose	73	1,3
Arabinose	50	0,75
Fructose	55	1
Mannose	63	1,14
Ribose	--	--
Rhamnose	117	2,1
Gesamt	504	8,79

Berechnung: mg Glucose/100 mg TSP

1 nmol Glucose: 180,15 ng = 113 nmol : x ng

Bei den anderen Zuckern werden die entsprechenden Molekulargewichte und nmol-Mengen eingesetzt.

Die Abweichung des hier erhaltenen Gesamtzuckergehaltes/ 100 mg TSP gegenüber dem mit der Anthron-Methode (siehe 2.3.) erhaltenen Wert ist mit Hydrolyseverlusten zu erklären.

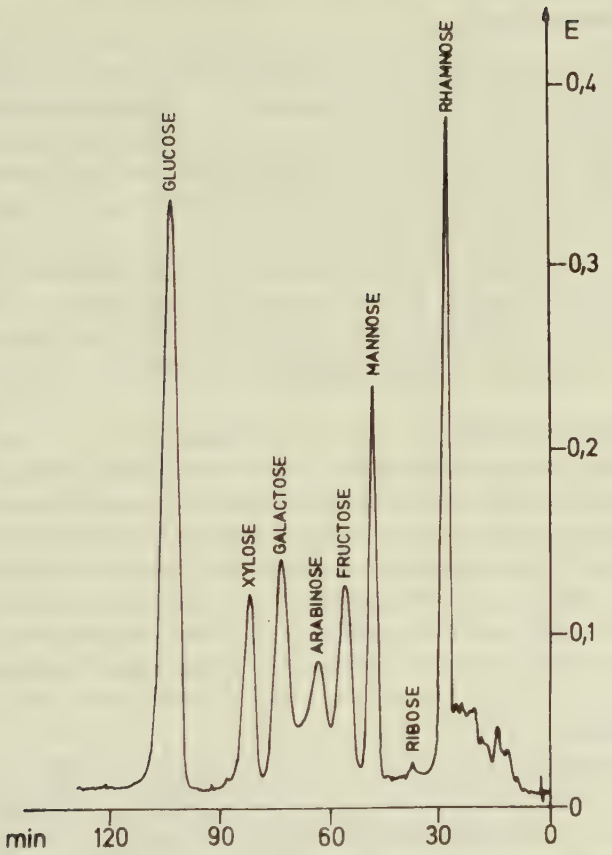


Abb. 8: Zuckerchromatogramm der Tagessammelprobe.
Isokratische Trennung. Säule: 0,6 x 28 cm,
Durrum DA-X4, Boratpuffer: 0,4 M, pH 9,3,
Pufferdurchfluß 60 ml/h. Säulentemperatur: 55° C
Aufgetragene Menge: 1 mg Hydrolysat/500 µl Boratpuffer

2.4. Modellhydrolysen zwischen Zuckern und Rinderserumalbumin

Die Tagessammelprobe ist ein Substanzgemisch aus Proteinen, Peptiden, Kohlenhydraten und Huminanteilen. Es bestand daher die Vermutung, daß während der sauren Hydrolyse insbesondere zwischen Proteinen und Kohlenhydraten Reaktionen stattfinden. Diese könnten dann zum Auftreten der bisher unbekannten Substanzen führen.
Deshalb erfolgte die Durchführung von Modellhydrolysen. Stellvertretend wurde Rinderserumalbumin als Protein eingesetzt; seine Konzentration sowie die der synthetischen Zucker entsprach der Tagessammelprobe (siehe 2.3.2.).

Versuchsdurchführung:

10 mg Rinderserumalbumin und 8,8 mg Zuckergemisch wurden gemäß 3.4.4. unter sauren Bedingungen hydrolysiert und aufgearbeitet. Das Hydrolysat wurde anschließend in Citratpuffer pH 3,2 aufgenommen und 0,5 ml mit 1500 nmol Gesamtaminosäuregehalt zur Trennung auf die Säule aufgetragen. Außerdem wurden zum Vergleich 8,8 mg Zuckergemisch unter den gleichen Bedingungen umgesetzt und chromatographiert*.

Auswertung:

Das Modell-Hydrolysat (Abb. 10) weist im Bereich zwischen Ninhydrinpeak und Asparaginsäure drei Substanzen auf. Sie entsprechen denen der Tagessammelproben Hydrolysate (Abb. 9). Diese Substanzen entstehen jedoch auch beim Abbau der vorhandenen Zucker in Abwesenheit von Rinderserumalbumin (siehe Abb. 11). Die drei Substanzen sind damit keine Produkte der Reaktion zwischen Aminosäuren und Zuckern unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse. Letzteres gilt auch für die unbekannten Substanzen zwischen Phenylalanin und Arginin.

* Für die Aufnahme der Chromatogramme danke ich Fräulein S. Naumann.

Die Peakform der ersten unbekannten Substanz SO zwischen Ninhydrin und Asparaginsäure (siehe Abb. 9) weist eine geringe "Schwanzbildung" auf. Es bestand daher die Vermutung, daß es sich hier um unspezifisch im Bereich von 440 nm und 570 nm absorbierende höhermolekulare Anteile der Tagessammelprobe handelt. Daher wurden 0,3 mg nichthydrolysierte Tagessammelprobe chromatographiert. Abb. 12 zeigt, daß Peakform und Absorptionsverhalten mit dem ersten Peak des Hydrolysats der Tagessammelprobe, des Modellhydrolysats und des synthetischen Zuckergemischs übereinstimmen.
Es handelt sich hier ebenfalls wie bei der Tagessammelprobe um höhermolekulare gelblich-bräunliche Substanzen, die aber nicht mit denen der Tagessammelprobe identisch sein müssen (3).
Sie geben auch der Tagessammelprobe ihre charakteristische Farbe. Eine zunehmende Vertiefung der Färbung ist sowohl bei den Tagessammelproben als auch bei den Modellhydrolysen bis zur Beendigung der sauren Hydrolyse zu beobachten.
Diese Anteile werden bei der präparativen Pyridin/Acetat Gradienten-Elution der Tagessammelproben überwiegend mit den ersten beiden Fraktionen eluiert.
Chromatographiert man die erste der beiden gefärbten Fraktionen im Beckman-Multichrom B-Aminosäureanalysator, so liegt sie im Bereich der Substanz SO. Die Ninhydrin-Reaktion liefert einen deutlichen Hinweis, daß es sich um eine unspezifische Absorption bei 440 nm und 570 nm handelt. Trägt man wenige µl der ersten Fraktion auf Kieselgel auf und besprüht mit Ninhydrin, so erfolgt keine Färbung nach Erhitzen auf 110° C für 10 Minuten.

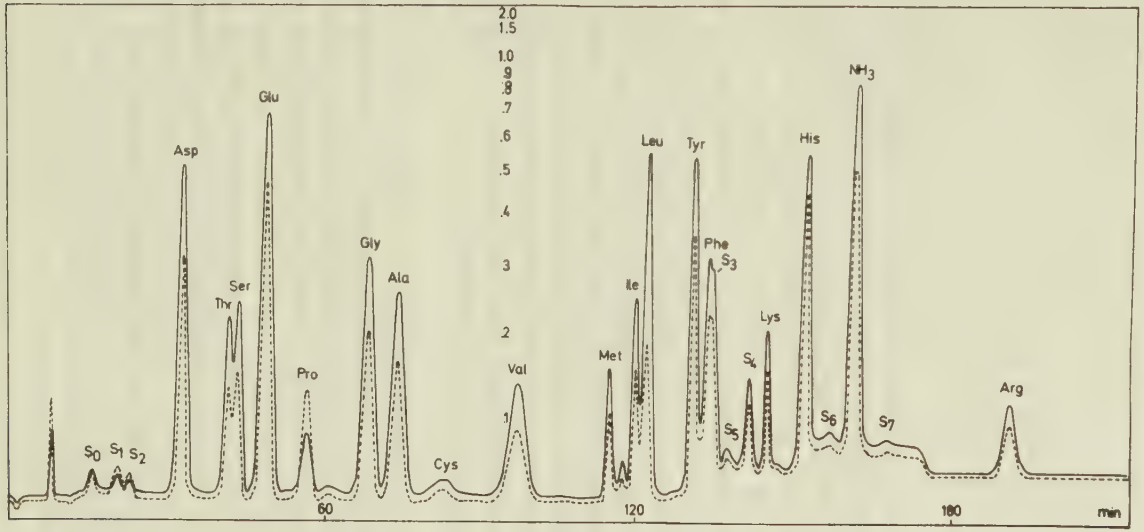


Abb. 9: Elutionsdiagramm des Hydrolysats der Tagessammelprobe.
1500 nmol Gesamtaminosäuren. Experimentelle Bedingungen siehe 2.3.1.

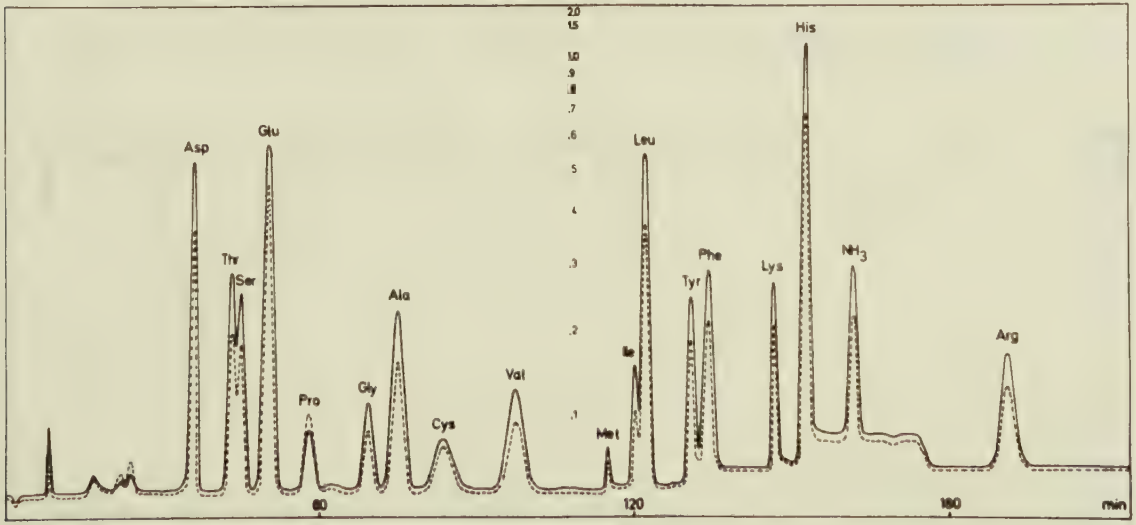


Abb. 10: Elutionsdiagramm des Modell-Hydrolysats Rinderserumalbumin-synthetisches Zuckergemisch. 1500 nmol Gesamtaminosäuren. Experimentelle Bedingungen siehe 2.3.1.

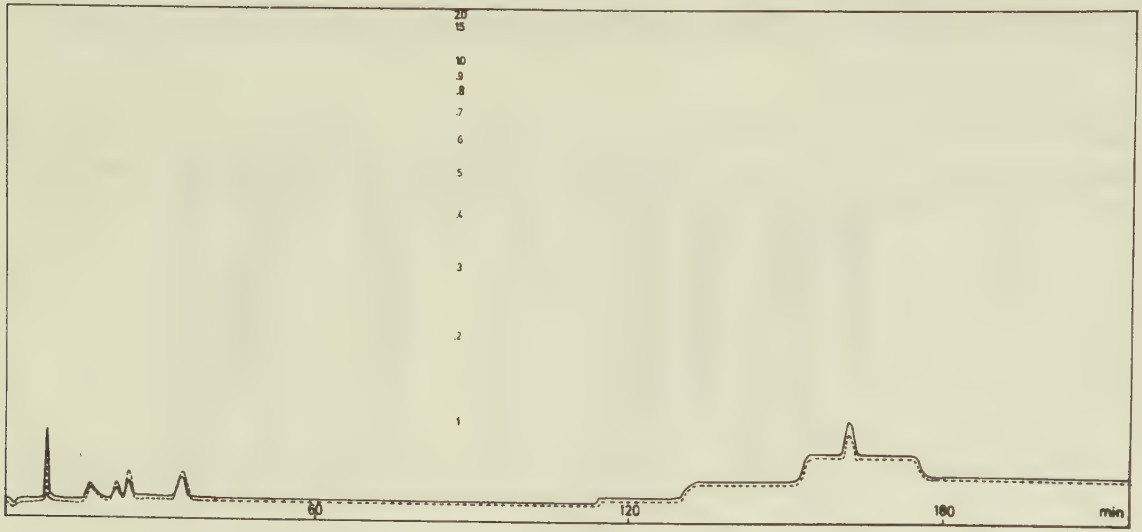


Abb. 11: Elutionsdiagramm des Hydrolysats eines synthetischen Zuckergemischs der Tagessammelprobe. 2500 nmol Gesamtzucker.
Experimentelle Bedingungen siehe 2.3.1.

Abb. 12: Elutionsdiagramm der nichthydrolysierten Tagessammelprobe.
0,3 mg Gesamtmenge. Experimentelle Bedingungen siehe 2.3.1.

2.5. Charakterisierung der ninhydrinpositiven Substanzen

2.5.1. Substanz S 1

a) Tests mit Sprühreagenzien

Der Sprühtest mit 2,6 Dichlorphenol-Indophenol-Natrium deutete auf eine organische Säure hin. Der Ninhydrintest fiel positiv aus. Mit Dimethylaminobenzaldehyd reagierte S 1 jedoch nicht. Dieses Reagenz setzt sich ebenfalls mit Aminogruppen um. Damit war nicht eindeutig klar, ob die Substanz eine Aminogruppe enthielt (siehe 3.6.).

b) Gaschromatographie/Massenspektrometrie *

Zur genaueren Identifizierung wurde S 1 dann mit 1,5 N HCl in Methanol verestert (siehe 3.7.1.) und eine GC/MS Analyse durchgeführt. Die Auswertung deutete auf Lävulinsäure hin. Eine nachfolgende GC/MS Analyse von Lävulinsäuremethylester als Vergleichssubstanz bewies dann eindeutig, daß die isolierte Substanz S 1 mit Lävulinsäure identisch ist.

Tab. 5: Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Lävulinsäuremethylester

$m/_e$	Fragment-Ion
130	M^+
115	$CH_3-CO-CH_2-CH_2-COO-$
99	$CH_3-CO-CH_2-CH_2-CO$
87	$CH_2-CH_2-COO-CH_3$
71	$CH_3-CO-CH_2-CH_2$
59	$COO-CH_3$
57	$CH_3-CO-CH_2$
43	CH_3-CO

* Herrn Graeme Nicholson danke ich für die vielen Mühen bei der Aufnahme zahlreicher Massenspektren

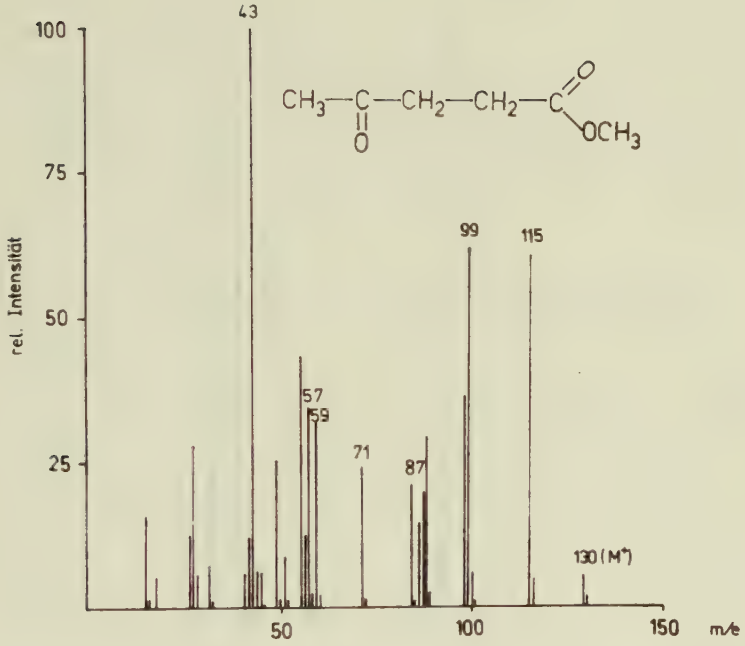


Abb. 13: Massenspektrum von Lävulinsäuremethylester
Varian MAT 711 GC/MS, 70 eV.

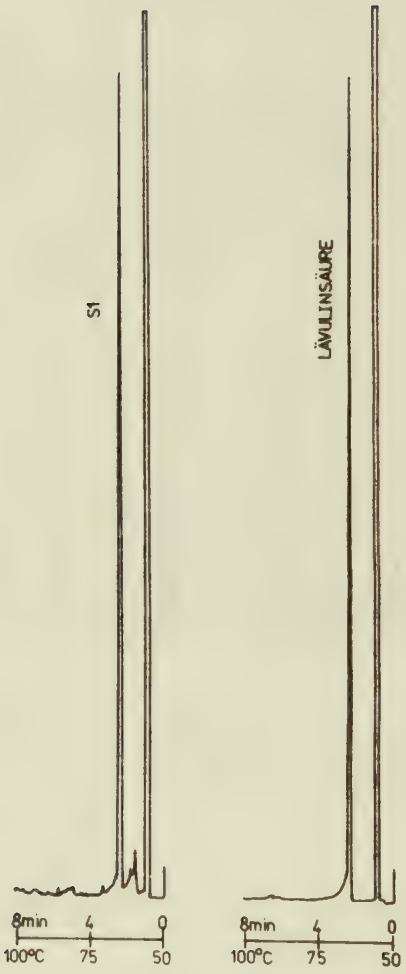


Abb. 14: Gaschromatogramm von S 1 und Lävulinsäuremethylester. Experimentelle Bedingungen siehe 3.7.6.

2.5.2. Substanz S 2

a) Tests mit Sprühreagenzien

Der Sprühtest mit 2,4-Diphenylhydrazin wies auf eine Aldehydverbindung ohne C=C-Doppelbindungen hin. Der Ninhydrintest fiel positiv aus. Mit Dimethylaminobenzaldehyd reagierte S 2 nicht. Damit war wie bei S 1 nicht eindeutig klar, ob die Substanz eine Aminogruppe enthielt.

b) Gaschromatographie

Da die Sprühtests im allgemeinen wenig aussagekräftig sind, war das Vorliegen einer sauren Verbindung nicht ausgeschlossen.
Die Veresterung mit 1,5 N HCl in Methanol und anschließende Aufnahme des Gaschromatogramms zeigte allerdings noch geringe Anteile Lävulinsäure. Das war durch die präparative Isolierung bedingt, da S 1 und S 2 dicht aufeinander folgten. Erst die Umsetzung von S 2 mit Methoxylaminhydrochlorid zur Derivatisierung von Ketogruppen und N,N-bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid zeigte auf dem Gaschromatogramm eine ganze Reihe von Verbindungen (siehe Abb. 14).
S 1 wies bei entsprechender Derivatisierung die gleichen Substanzen auf, wenn auch in unterschiedlicher Menge. So ist Peak 2 im Chromatogramm von S 2 wesentlich höher. Peak 2 kann daher als die ninhydrinpositive Substanz S 2 angesehen werden.

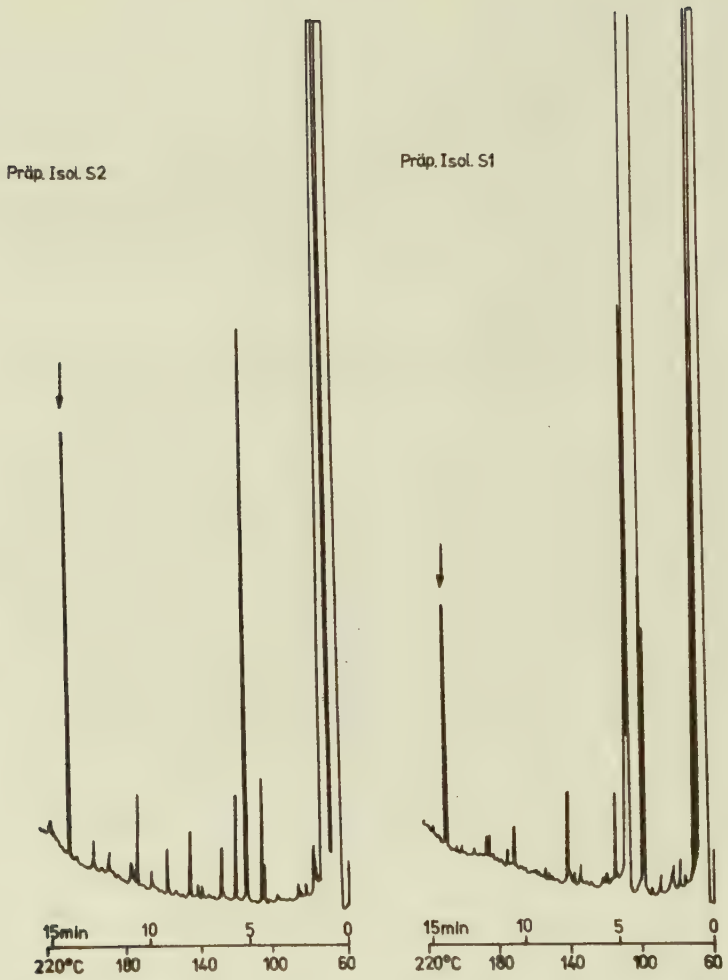


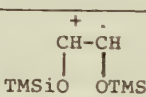
Abb. 15: Gaschromatogramm von S 1 und S 2, derivatisiert mit Methoxylaminhydrochlorid und N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid. Experimentelle Bedingungen siehe 3.7.6.

c) Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Zur näheren Charakterisierung wurde die Substanz mit Methoxylaminhydrochlorid und N,N-bis-trimethylsilyltrifluoracetamid umgesetzt und vom Derivat ein Massenspektrum aufgenommen.
Die Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen wurde unter Verwendung einer grundlegenden Arbeit von De Jongh et al. (27) zur massenspektrometrischen Analyse trimethylsilylierter Zuckerderivate durchgeführt. Die meisten intensiven Peaks des Massenspektrums konnten bereits bekannten Fragmenten zugeordnet werden (siehe Tab. 6). Danach handelt es sich bei der Verbindung um ein Hexosederivat. Sie enthält zumindest eine Aldehydgruppe. Das zeigt die ungerade Massenzahl 615 des Molekülions. Bei der Derivatisierung einer Keto- oder Aldehydgruppe mit Methoxylamin wird in die Verbindung ein Stickstoffatom eingeführt. Dies bedeutet stets eine ungerade Massenzahl für das Molekülion, wenn nicht bereits ein Stickstoffatom im Molekül enthalten ist.

Tab. 6: Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Substanz S 2, derivatisiert mit Methoxylaminhydrochlorid und N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid

$m/_e$	Fragment-Ion	Bemerkung
615	M^+	
319	TMSiO-C=CH-CH_2OTMSi | CH-OTMSi ⊕	Kann von C_2-C_5 oder C_3-C_6 herrühren
306	OTMSi | .HC=CHCH + | | TMSiO OTMSi	Isotop von 305
305	OTMSi | HC=CCH ⊕ | | TMSiO OTMSi	Stets vorhanden bei TMS-Derivaten von Kohlenhydraten. Diese Peaks enthalten hauptsächlich C_2, C_3 und C_4
265	$OSi(CH_3)_3$ | $(CH_3)_3SiO$-C-$CHOSi(CH_3)_3$ +	
217	+ CH =CH-CH | | TMSiO OTMSi	siehe $m/_e$ 305

m/e	Fragment-Ion	Bemerkung
204		Charakteristisch für TMS Derivate von Kohlenhydraten. Herkunft meist von C_2-C_3 und C_3-C_4
191	$(CH_3)_3SiOCH{=}OSi(CH_3)_3$	
147	$(CH_3)_3SiOSi(CH_3)_2$	typisch für Kohlenhydrate
133	$CH_3OCHOTMSi$	
129	$TMSiO{-}CH{-}CH{=}CH_2$	
117	$(CH_3)_2SiOCH_2{-}CH{=}O$	enthält C_5 und C_6 sowie den Ringsauerstoff
103	$CH_2{=}OSi(CH_3)_3$	
100	TMSiOH	
73	TMS	

d) Bestimmung der Kovats-Indices für S 2 und einige Uron- und Onsäuren

In biologischen Materialien finden sich sehr oft Uron- und Onsäuren (11). Während der sauren Hydrolyse werden solche allerdings größtenteils zerstört. Trotzdem sind sehr geringe Anteile nicht auszuschließen. Die Bestimmung der Kovats-Retentionsindices für S 2 und die unten aufgeführten Uron- und Onsäuren sollte klären, inwieweit in den Tagessammelproben solche vorliegen und mit S 2 identisch sind. Die Verbindungen wurden dazu entsprechend den Versuchsbedingungen von S 2 mit Methoxylaminhydrochlorid und N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid derivatisiert und die Gaschromatogramme gemäß 3.7.6. aufgenommen.

Zur Charakterisierung des Retentionsverhaltens der Probenkomponenten bzw. zu deren Identifizierung wird das Verhältnis unter identischen Bedingungen (Temperatur, Trägergasgeschwindigkeit) ermittelt. Die n-Paraffine sind so zu wählen, daß diese die zu charakterisierende Substanz möglichst eng einschließen, da starke Abweichungen bezüglich der Retentionszeiten die Richtigkeit der erhaltenen Retentionswerte beeinträchtigen. Definitionsgemäß ist der Retentionsindex für n-Paraffine das 100-fache ihrer C-Zahl, z.B. für n-Hexan I = 600 (28).

Formel zur Berechnung des Kovats-Index:

t_o = Retentionszeit (Durchbruchzeit) einer nicht verzögerten Komponenten (Inertpeak = Lösungsmittelpeak)

t_R = Retentionszeit einer retardierten Komponenten

t'_R = Reduzierte Retentionszeit, $t'_R = t_R - t_o$

x = die interessierende Substanz

z = der n-Paraffinkohlenwasserstoff mit z-Kohlenstoff-Atomen, der vor der interessierenden Substanz erscheint

z+1 = der n-Paraffinkohlenwasserstoff mit (z+1) Kohlenstoff-Atomen, der nach der interessierenden Substanz erscheint.

I = Retentionsindex der interessierenden Substanz, berechnet nach:

$$I = 100\,z + 100\,x\,\frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(z)}}{\log t'_{R(z+1)} - \log t'_{R(z)}}$$

Tab. 7: Versuchsergebnisse: t_o = 38 sec

Substanz	t_R (sec)	t'_R (sec)
S 2	1160	1122
Glucuronsäure	450	412
Galacturonsäure	370	332
Gluconsäure	480	442
Galactonsäure	465	427
C_{18}	290	252
C_{20}	650	612
C_{22}	1430	1392

S 2 sowie die Uron- und Onsäuren wurden mit Methoxylaminhydrochlorid und N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid derivatisiert.

Beispiel zur Berechnung des Retentionsindex für Glucuronsäure:

$$I = 100 \times 18 + 100 \cdot \frac{\log (450 - 38) - \log (290 - 38)}{\log (650 - 38) - \log (290 - 38)}$$

I = 1860

Werte für die Kovats-Retentionsindices:

$I_{S\ 2}$ = 2072

$I_{Glucuronsäure}$ = 1860

$I_{Galacturonsäure}$ = 1831

$I_{Gluconsäure}$ = 1864

$I_{Galactonsäure}$ = 1859

Die Substanzen wurden entsprechend der Anmerkung unter Tab. 7 derivatisiert.

Ergebnis: S 2 ist mit keiner der eingesetzten Vergleichssubstanzen identisch.

3.5.3. Substanz S 3 und S 4

a) Test mit Sprühreagenzien

Der Sprühtest wies auf Aminozucker hin (siehe 3.6.).

b) Dünnschichtchromatographie und Aminosäureanalyse

Die Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Aminozuckern auf Kieselgelplatten zeigte, daß die R_f-Werte bei S 3 mit Glucosamin und bei S 4 mit Galactosamin übereinstimmen.

Tab. 8: R_f Werte verschiedener Aminozucker sowie S 3 und S 4

Substanz	R_f
S 3	0,185
S 4	0,135
Glucosamin	0,185
Galactosamin	0,135
Ribosamin	0,225
Arabinosamin	0,180
Mannosamin	0,190

Laufmittel: n-BuOH-EtOH-Isopropanol-NH_3-H_2O
(2:4:0,5:0,5:0,5)

Laufstrecke: 10 cm

Im Aminosäureanalysator wiesen Glucosamin und Galactosamin dieselben Retentionszeiten wie S 3 und S 4 auf. S 3 und Glucosamin sowie S 4 und Galactasomin zeigten Verdoppelung der Peakfläche.

c) Gaschromatographie/Massenspektrometrie

S 3 und S 4 sowie Glucosamin und Galactosamin als Vergleichssubstanzen wurden mit Trifluoracetanhydrid derivatisiert. Die Retentionswerte zeigen eindeutig, daß S 3 mit Glucosamin und S 4 mit Galactosamin identisch sind (Siehe Abb. 16 u. 17).

Die GC/MS Analyse aller vier Verbindungen bestätigte dies. Die Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen wurde unter Verwendung einer grundlegenden Veröffentlichung von W.König et al. (40) zur massenspektrometrischen Analyse trifluoracetylierter Hexosen durchgeführt.

Tab. 9: Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Glucosamin und Galactosamin als trifluoracetylierte Derivate

$m/_e$	Fragment-Ion
659	M^+
546	M - TFAO
432	M - (TFAO + TFAOH)
412	M - (2TFAOH + F)
403	M - (TFAOH + TFAO-CH=O)
318	M - (2TFAOH + $TFANH_2$)
288	M - (3TFAOH + CHO)
276	M - (TFAOH + TFAO-CH_2 + TFAO-CH=O)
264	TFANH-CH=CH-CH=OTFA
251	TFANH-CH-CH-OTFA

Abb. 16: Gaschromatogramm von S 3 und Glucosamin als trifluoracetylierte Derivate.
Experimentelle Bedingungen siehe 3.7.6.

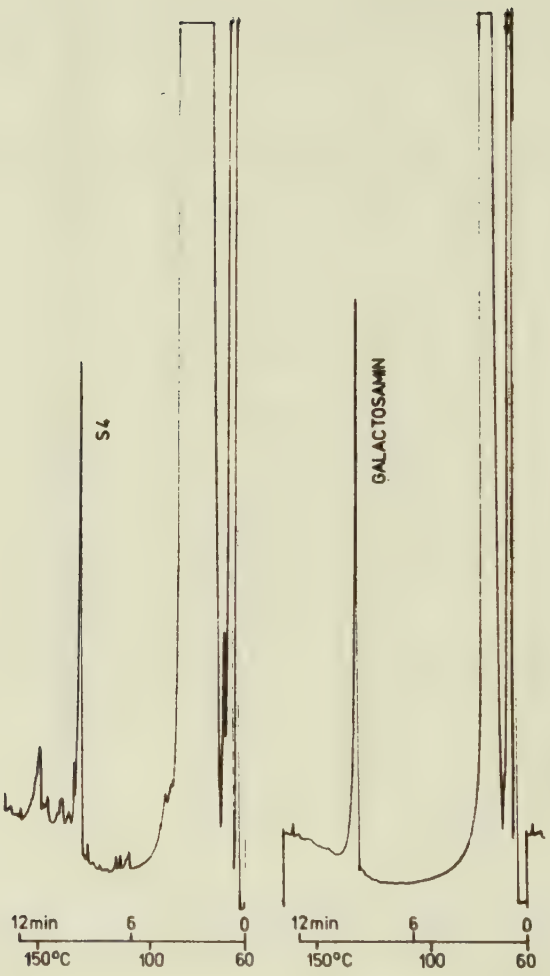


Abb. 17: Gaschromatogramm von S 4 und Galactosamin als trifluoracetylierte Derivate.
Experimentelle Bedingungen siehe 3.7.6.

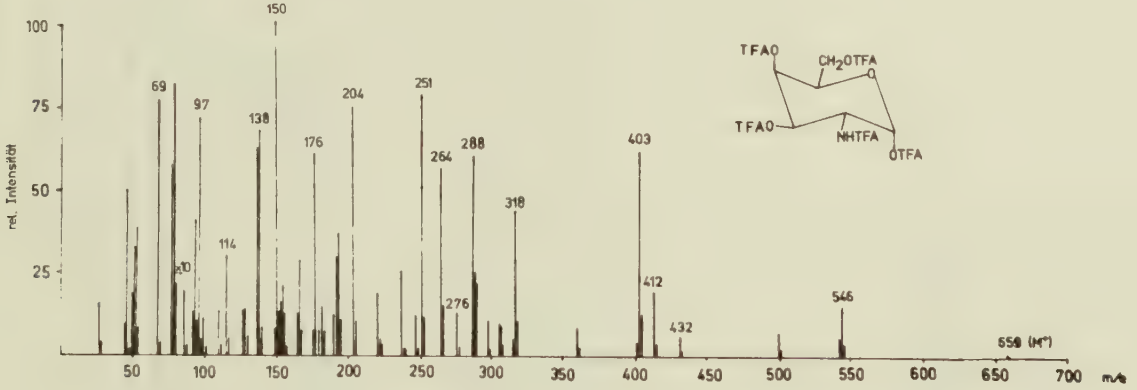


Abb. 18: Massenspektrum von Glucosamin nach Trifluoracetylierung.
Varian MAT 711, Direkteinlaßsystem. Ionenquellen-Temp. 170° C, 70 eV.

2.5.4. Substanz S 5

a) Tests mit Sprühreagenzien

S 5 reagierte sowohl mit Ninhydrin als auch mit Dimethylaminobenzaldehyd. Die Ergebnisse des Tests auf Aminozucker waren unsicher. Offensichtlich ist es auch kein stickstoffhaltiger Heterocyclus.

b) Aminosäureanalyse

Das Retentionsverhalten von S 5 im Aminosäureanalysator (siehe Abb. 9) zeigte, daß es sich um eine relativ basische Substanz handeln mußte.

c) UV-Spektroskopie

Das UV-Spektrum der in destilliertem Wasser gelösten Substanz zeigte im Bereich von 240 - 270 nm aromatischen Charakter (siehe Abb. 19). Phenylalanin als aromatische Aminosäure zeigt im gleichen Bereich ein sehr ähnliches Spektrum (29).

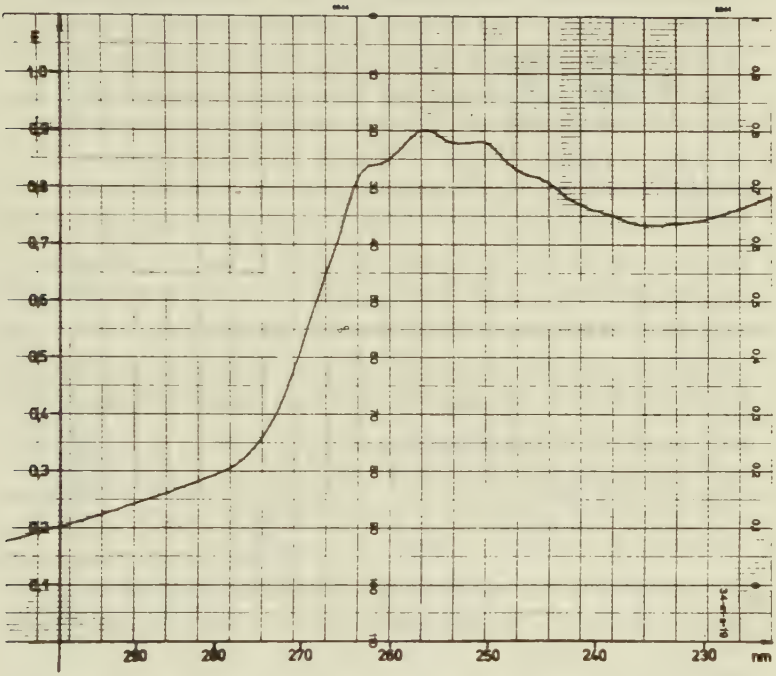


Abb. 19: UV-Spektrum von Substanz S 5
0,5 mg/2 ml dest. Wasser. Schichtdicke 1 cm

d) Gaschromatographie/Massenspektroskopie

1) Die trifluoracetylierte Substanz erwies sich als gaschromatographisch einheitliche Substanz (siehe Abb. 20). Deswegen wurde zur Aufnahme der Massenspektren das Direkteinlaßsystem verwendet. Die im Gaschromatogramm vor der Hauptsubstanz erscheinenden Verunreinigungen können durch langsames Aufheizen des Probenstabes verdampft werden. Das System hat den Vorteil, daß noch kleinere Substanzmengen als bei der Gaschromatographie eingesetzt werden können. Dies war wichtig, da verschiedene Derivatisierungsverfahren eingesetzt wurden und die Substanz nur im Bereich von maximal 0,5 mg vorlag.

2) Die derivatisierte Substanz scheint ein Molekulargewicht von 846 zu haben, denn das Ion m/e 733 hat eine sinnvolle Massendifferenz (M - TFAO) zum Molekülion.

3) Das Molekülion ist geradzahlig. Dies bedeutet, daß mindestens 2 Stickstoffatome in der Verbindung vorliegen.

4) Der Vergleich von Massendifferenzen gleicher Bruchstücke des trifluoracetylierten und pentafluorpropionylierten Derivats weist auf maximal sechs funktionelle Gruppen (Amino- und Hydroxylgruppen) hin (siehe Tab. 12).

5) Der im UV-Spektrum erkennbare aromatische Charakter der Substanz ist im Massenspektrum nicht eindeutig ausgewiesen.
Maxima im unteren Bereich für m/e 39,50,51 werden nicht durch die für Aromaten typischen Maxima bei m/e 77 oder m/e 91 hinreichend deutlich ergänzt. Diese Peaks sind gegenüber m/e 50 und m/e 51 sehr klein.
Das Auftreten der Differenzmassen m/e 51 und m/e 91 sowohl beim trifluoracetylierten als auch beim pentafluorpropionylierten Derivat gibt allerdings wiederum Hinweise, daß die Substanz einen aromatischen Anteil besitzen könnte.

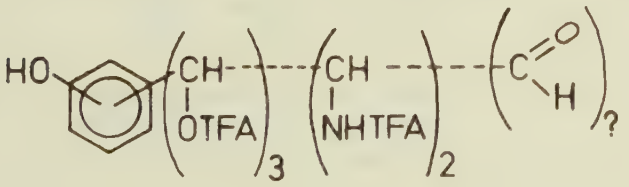
Maxima für m/e 52 und m/e 79 zeigen, daß Pyridin als Bestandteil des Derivatisierungsreagenz nicht vollständig vor Aufnahme des Massenspektrums entfernt werden konnte.

6) Maxima im unteren Bereich für m/e 43,44 und das relativ starke Ion m/e 57 deuten auf einen aliphatischen Anteil der Substanz hin.
Das Auftreten der Differenzmasse m/e 29 sowohl beim trifluoracetylierten als auch beim pentafluorpropionylierten Derivat weist eventuell auf eine Aldehydgruppe hin.
Allerdings kann die m/e 29 Abspaltung auch aromatisch gebundenen Sauerstoff bedeuten.

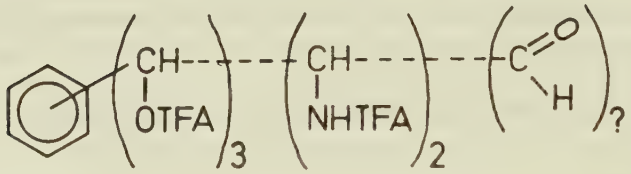
Auswertung:

Das UV-Spektrum zeigte im Bereich von 240-270 nm aromatischen Charakter.
Die Auswertung des Massenspektrums zeigte dies nicht so deutlich.
Der Vergleich der Fragmentionen der trifluoracetylierten und pentafluorpropionylierten Derivate ergab, daß die Substanz mit großer Sicherheit sechs funktionelle Gruppen (Hydroxyl- und Aminogruppen) trägt.
Nach den vorliegenden Ergebnissen enthält die Substanz offensichtlich einen aromatischen Anteil. Dieser ist möglicherweise an einen Aminozuckerrest gebunden.

Vorschlag für eine mögliche Strukturformel von Substanz S 5:



Im Massenspektrum des trifluoracetylierten Derivates von S 5 finden sich zwei Bruchstücke, die auch beim theoretischen Zerfall der vorgeschlagenen möglichen Strukturformel entstehen:



Fragment-Ione m/e 733 entspricht m/e 983 beim pentafluorpropionylierten Derivat.

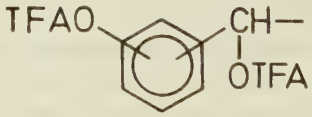
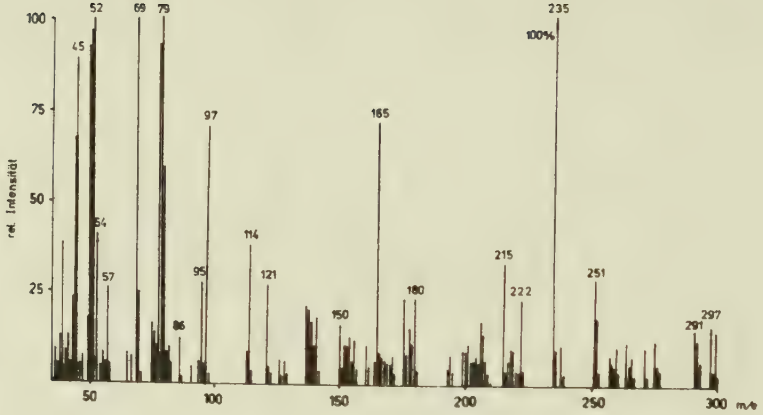
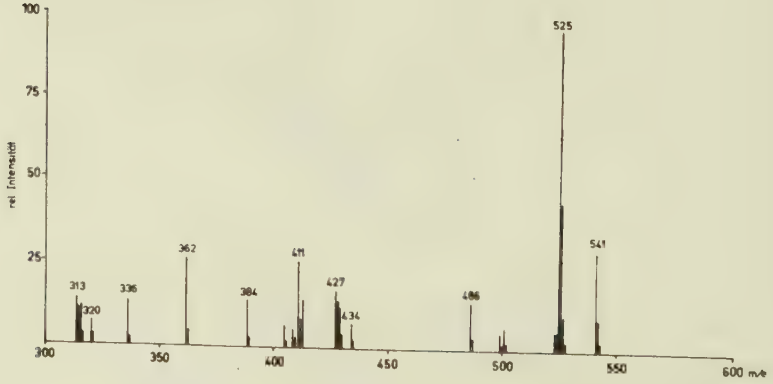


Abb. 20: Gaschromatogramm von Substanz S 5 als trifluoracetyliertes Derivat.
Experimentelle Bedingungen siehe 3.7.6.


rel. Intensität
100
75
50
25
52
69
79
45
235
100%
97
165
54
114
215
57
95
121
222
251
180
86
150
291
297
50
100
150
200
250
300 m/e


rel. Intensität
100
75
50
25
525
362
411
541
313
336
384
427
320
434
486
300
350
400
450
500
550
600 m/e

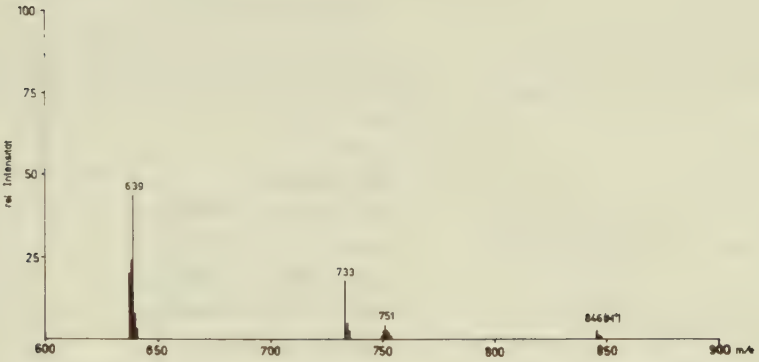


Abb. 21: Massenspektrum von Substanz S 5 nach Trifluoracetylierung *.
Varian MAT 711, Direkteinlaßsystem, Ionenquellen-Temperatur 200° C, 70 eV

* Für die Aufnahme dieses und der folgenden Massenspektren danke ich Herrn H. Bartholomä.

Tab. 10: Interpretation einiger Fragment-Ionen von S 5 als trifluoracetyliertes Derivat

$m/_e$	Fragment-Ion
846	M^+
	M - TFAO
733	oder
	M - $TFANH_2$
	M - (TFANH + TFAO)
639	oder
	M - (TFANH + $TFANH_2$)
235	evtl. TFAN=C-NH-TFA
251	TFAOCH-CHNHTFA

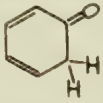
Tab. 11: Interpretation einiger Fragment-Ionen von S 5 als pentafluorpropionyliertes Derivat

$m/_e$	Fragment-Ion
1166	M^+
	M - PFPO
1003	oder
	M - $PFPNH_2$
	M - (PFPOH + PFPO)
839	oder
	M - (PFPOH + $PFPNH_2$)
335	evtl. PFPN=C-NH-PFP
351	PFPOCH-CHNHPFP

Tab. 12: Ermittlung der Anzahl funktioneller Gruppen von S 5 durch Vergleich der wichtigsten Fragment-Ionen des pentafluorpropionylierten und trifluoracetylierten Derivates.

PFP-Derivat $m/_e$	TFA-Derivat $m/_e$	Differenz $m/_e$ PFP - TFA	Bemerkung
1166	846 (866-HF?)	320	Differenz weist auf 6 funktionelle Gruppen hin
983	733	250	Bruchstück enthält 5 funktionelle Gruppen
839	639	200	Bruchstück enthält 4 funktionelle Gruppen
675	525	150	Bruchstück enthält 3 funktionelle Gruppen
584	434	150	Bruchstück enthält 3 funktionelle Gruppen
391	291	100	Bruchstück enthält 2 funktionelle Gruppen
351	251	100	Bruchstück enthält 2 funktionelle Gruppen

Tab. 13: Interpretation der wichtigsten Differenzmassen von S 5 als trifluoracetyliertes Derivat.

$m/_e$	Differenzmasse	Bemerkung
751 733	18	H_2O Abspaltung
751 639	112	Abspaltung von TFANH
733 639	94	evtl. Abspaltung von 
639 525	114	evtl. Abspaltung von TFAOH
525 434	91	weist evtl. auf Aromaten hin
541 427	114	Abspaltung von TFAOH
525 411	114	Abspaltung von TFAOH
411 320	91	weist evtl. auf Aromaten hin
411 297	114	Abspaltung von TFAOH
320 291	29	weist evtl. auf Aldehyd-gruppe hin
165 114	51	weist evtl. auf Aromaten-bruchstück hin

Tab. 14: Interpretation der wichtigsten Differenzmassen von S 5 als pentafluorpropionyliertes Derivat

m/e	Differenzmasse	Bemerkung
1166 1148	18	H_2O Abspaltung
1001 983	18	H_2O Abspaltung
838 691	147	Abspaltung von PFP
839 675	164	Abspaltung von PFPOH
675 584	91	weist evtl. auf Aromaten hin
635 584	51	weist evtl. auf Aromaten-bruchstück hin
584 555	29	weist evtl. auf Aldehyd-gruppe hin
511 420	91	weist evtl. auf Aromaten hin
420 391	29	weist evtl. auf Adehyd-gruppe hin
411 264	147	Abspaltung von PFP
335 188	147	Abspaltung von PFP
307 256	51	weist evtl. auf Aromaten bruchstück hin

Bermerkung: Die Differenzmasse m/e 29 kann auch aromatisch gebundenen Sauerstoff bedeuten.

2.5.5. Substanz S 6 und S 7

a) Vorbemerkung:

Bei der präparativen Trennung von Pyridin/Acetatpuffer wurden zwischen S 5 und Ammoniak ninhydrinpositive Fraktionen gefunden, die an dieser Stelle im Aminosäureanalysator mit Natriumcitratpuffer als Elutionsmittel nicht auftraten. Eine Rechromatographie des isolierten Materials zeigte, daß es sich um die als S 6 und S 7 bezeichneten Substanzen handelte.

Da fast 5 mg Substanz isoliert werden konnten, war die Aufnahme eines IR-Spektrums zur Ermittlung funktioneller Gruppen möglich. Die Auswertung ergab lediglich Natriumacetat. Die Aufnahme eines IR-Spektrums von Natriumacetat als Vergleichssubstanz bewies dies (siehe Abb. 22 und 23).
Daß tatsächlich überwiegend Natriumacetat vorliegt, zeigte die Atomabsorptionsspektroskopie*.
0,1 mg isolierter Substanz enthielten 0,04 mg Natrium.
Beide ninhydrinpositive Substanzen lagen also gegenüber Natriumacetat in sehr geringer Menge vor. Aufgrund der Abwesenheit anderer charakteristischer Banden als solcher von CH- und NH- oder OH-Schwingungen wurde geschlossen, daß es sich um chemisch sehr einfach strukturierte Substanzen handelte.
Beim Auftreten des Substanzgemisches werden auch die anwesenden Natriumionen im oberen engen Bereich des Harzes ionisch gebunden. Mit ansteigendem Pyridinacetatgradienten werden die kationischen Substanzen abhängig von ihrem pK-Wert und der Selektivität des Ionenaustauschers nacheinander eluiert; dies trifft auch für die Natriumionen zu. Sie wandern als "Bande" durch die Säule, wobei sie durch ihre hohe Ionenstärke die beiden Substanzen S 6 und S 7 vor sich her schieben. Hiermit kann auch die Nichtauftrennung der beiden Substanzen erklärt werden.

* Herrn K. Weingärtner danke ich für die Durchführung der Messungen.

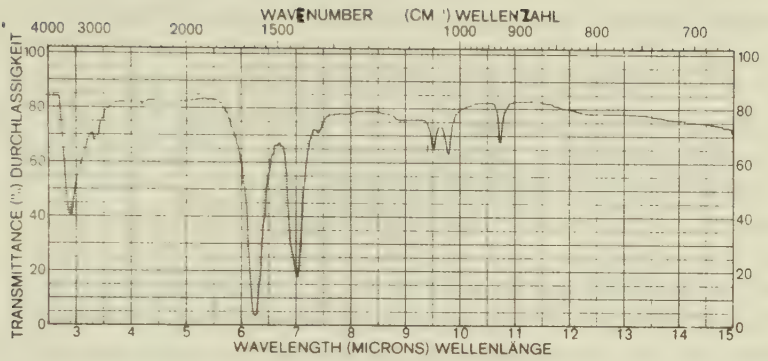


Abb. 22: IR-Spektrum von Substanz S 6 und S 7

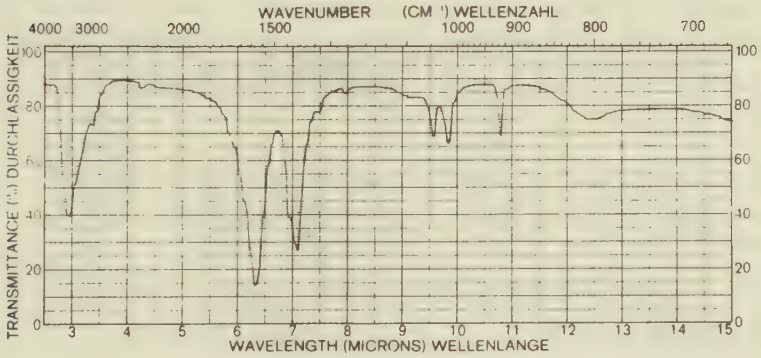


Abb. 23: IR-Spektrum von Natriumacetat

b) Test mit Sprühreagenzien

Der Sprühtest zeigte lediglich, daß es sich um aminogruppenhaltige Substanzen handeln mußte (siehe 3.6.).

c) Dünnschichtchromatographie und Aminosäureanalyse

Die Dünnschichtchromatographie der dansylierten Substanzen auf Kieselgelplatten zeigte ebenfalls wie die Aminosäureanalyse, daß zwei Verbindungen vorlagen.
Die beiden Substanzen wanderten im für dansylierte Aminosäuren verwendeten Laufmittel (siehe Tab. 15) nahezu mit der Front. Nach den Untersuchungen von Seiler et al. (30) deutete dies sowie ihre intensiv gelbgrüne Fluoreszenz unter der UV-Lampe (365 nm) auf Amine hin. Ein von Seiler für Amine eingesetztes Laufmittel (siehe Tab. 16) zeigte bessere Auftrennung. Die Dansyl-Derivate von Methylamin, Dimethylamin und Äthanolamin dienten als Vergleichssubstanzen.

Tab. 15:

Substanz	R_f Wert
S 6	0,9
S 7	0,78
DANS-Methylamin	0,83
DANS-Dimethylamin	0,9
DANS-Äthanolamin	0,78

Laufstrecke: 10 cm

Laufmittel:

$CHCl_3$:MeOH:HAc

75 : 20 : 5

Tab. 16:

Substanz	R_f Wert
S 6	0,19
S 7	0,56
DANS-Methylamin	0,52
DANS-Dimethylamin	0,56
DANS-Äthanolamin	0,20

Laufstrecke: 10 cm

Laufmittel:

Äthylacetat : Cyclohexan

3 : 2

Anhand der R_f Werte ergibt sich, daß S 6 mit Äthanolamin und S 7 mit Dimethylamin übereinstimmt.
Anschließend wurden die Retentionszeiten von Äthanolamin und Dimethylamin im ASA ermittelt. Jeweils 0,1 µMol der Hydrochloride wurden mit der Aminosäuretestlösung eingespritzt. Die Werte lagen genau im Bereich der Substanzen S 6 und S 7. S 6 und S 7 wurden zusammen mit Äthanolamin-HCl und Dimethylamin-HCl eingespritzt. Es ergab sich eine Verdoppelung der jeweiligen Peakfläche.

d) Massenspektrometrie

Zur endgültigen Identifizierung von S 6 und S 7 als Dansylderivate wurden Massenspektren aufgenommen.
DANS-Dimethylamin und DANS-Äthanolamin dienten als Vergleichssubstanzen. Zur Aufnahme der Spektren wurde ein beheizbares Direkteinlaßsystem verwendet. Die in der Probe vorliegenden Dansylderivate S 6 und S 7 ließen sich durch langsames Aufheizen des Probenstabes im Direkteinlaßsystem einwandfrei voneinander trennen.
Die Auswertung der Massenspektren von S 6 und S 7 sowie der Vergleichssubstanzen zeigte, daß S 6 mit Äthanolamin und S 7 mit Dimethylamin identisch ist.

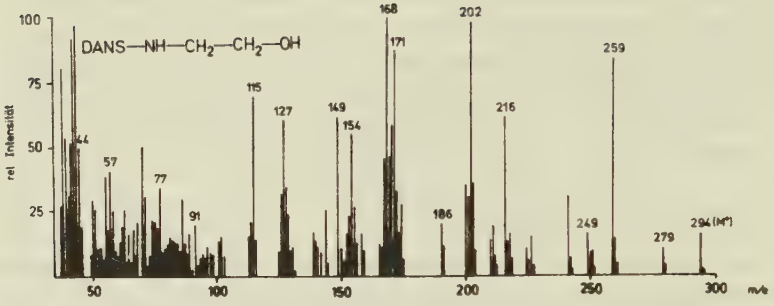


Abb. 24: Massenspektrum von DANS-Äthanolamin.
Varian MAT 711, Direkteinlaßsystem, Ionenquellen-Temp. 220° C, 70 eV.

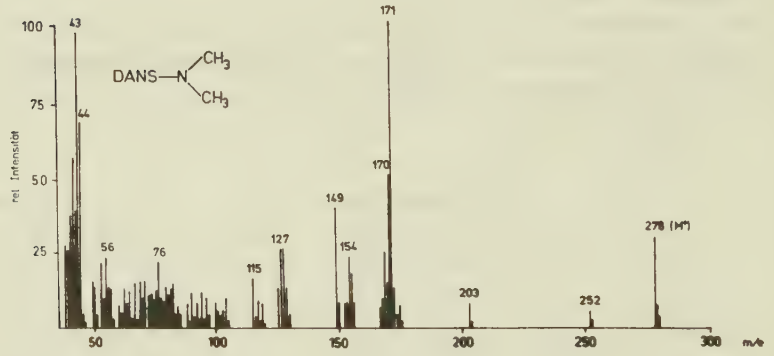


Abb. 25: Massenspektrum von DANS-Dimethylamin.
Varian MAT 711, Direkteinlaßsystem, Ionenquellen-Temp. 220° C, 70 eV.

Tab. 17: Zur Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von DANS-Äthanolamin

$m/_e$	Fragment-Ion	Bemerkung
294	M^+	
279	$M - CH_3$	Verlust einer CH_3-Gruppe vom DANS-Rest
259	$M - CH_2-CH_2-OH$	
249	DANS-NH	
216	$M - C_6H_6$	Beide Bruchstücke stammen offensichtlich aus dem Dansylrest
202	$M - C_7H_8$	
186	)	
171	)	
170	)	Diese Bruchstücke stammen aus
154	)	dem Dansylrest
127	)	
115	)	
44	CH_3-N-CH_3	Abspaltung der Dimethylamino-gruppe aus dem Dansylrest

Tab. 18: Zur Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von DANS -Dimethylamin

$m/_e$	Fragment-Ion		Bemerkung
278	M^+		
171		)	
170		)	Diese Bruchstücke stammen
154		)	aus dem DANS-Rest
127		)	
115		)	
44	CH_3-N-CH_3		

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Geräte und Materialien

Automatischer Probennehmer FW 1 für Abwasser von Firma Schmid, Entringen/Tübingen.

Ultrafiltrations- und Sterilfiltrationszellen aus der Werkstatt des CZI.

Ultrafiltrationsmembranen UM 2 von Amicon, Oosterhout Holland.

Selectron-Sterilfilter mit Porengröße 0,2 µ von Schleicher und Schüll, Dassel.

Selectron-Glasfaservorfilter GF 92 von Schleicher und Schüll, Dassel.

Tischzentrifuge Rotina/S von Firma Hettich, Tuttlingen.

Zeiss-Photometer PMQ 2 von Firma C. Zeiss, Oberkochen.

UV Spektrophotometer M4Q III von Firma Zeiss, Oberkochen.

IR-Spektrograph Infracord von Perkin-Elmer, Überlingen.

Gaschromatograph Fractovap 2101 von Carlo-Erba.

Massenspektrometer MAT 711 von Varian, Bremen.

Aminosäureanalysator Multichrom-B von Beckman, München.

3.2. Chemikalien

Rinderserumalbumin, Cysteinsäure, Glucosamin-HCl und Galactosamin-HCl stammen von der Firma Serva.

Methoxylamin-HCl zur Derivatisierung von Ketogruppen wurde von Pierce Chemicals bezogen.

Trifluoracetanhydrin, Pentafluorpropionsäureanhydrid und N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoreacetamid zur Derivatisierung für die Gaschromatographie wurden von der Firma Merck bezogen.

Ebenso Dansylchlorid, Dimethylaminonaphthalinsulfonsäurechlorid, die Fertigplatten für die Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 ohne Fluoreszensindikator) sowie alle anderen Chemikalien.

3.3. Lösungsmittel und Reagenzien

1. Pyridin:

Pyridin wird über Kaliumhydroxid für 24 Stunden getrocknet, dekantiert, pro Liter 1 g Ninhydrin zur Entfernung von Aminen hinzugegeben und bei Atmosphärendurck über eine 50 cm Vigreuxkolonne destilliert.

2. Essigsäure:

Essigsäure wird bei Atmosphärendurck über eine 50 cm Vigreuxkolonne destilliert.

3. Ninhydrin-Reagens: (31)

100 ml 4 N Natriumacetatpuffer
300 ml Methylcellosolve (Diäthylenglykolmonomethyläther)
8 g Ninhydrin
0,16 g $SnCl_2 \times 2H_2O$

Das Reagenz ist für jeden Versuch stets neu anzusetzen.

4. Anthron-Reagenz:

0,2 g Anthron werden zu 5 ml Äthanol abs. gegeben und mit 75% H_2SO_4 (75 ml H_2SO_4 konz. und 25 ml dest. Wasser) auf 100 ml aufgefüllt. Mit Magnetrührer ist bis zur vollständigen Lösung des Anthrons zu rühren.
Das Reagenz ist für jeden Versuch stets neu anzusetzen.

3.4. Arbeitsmethoden

3.4.1. Aufarbeitung der Tagessammelprobe

20 Liter Abwasser wurden mit einem automatischen zeitproportional arbeitenden Probennehmer der Firma Schmid tagsüber in einem Zeitraum von neun Stunden entnommen. Die Probe wurde bei 4° C gekühlt, Damit war bakterielles Wachstum und eine Veränderung der Zusammensetzung durch mikrobielle Umsetzung ausgeschlossen.
Nach der Entnahme wurde die Probe mit einer Milchzentrifuge bei 3000 UPM von Schmutzteilchen befreit. Die anschließende Sterilfiltration erfolgte unter Stickstoffdruck bei 3 kp/cm² mit 0,2 µ Membranen und Glasfaservorfiltern GF 92 der Firma Schleicher und Schüll.
Darauf wurde die Tagessammelprobe durch Ultrafiltration auf ungefähr 1 L einkonzentriert und anschließend zur vollständigen Entsalzung und Entfernung aller niedermolekularen Substanzen mit ca. 20 L destilliertem Wasser gewaschen.

Bei der Ultrafiltration lag die Ausschlußgrenze beim Molekulargewicht von 1 000. Verwendung fanden Amicon UM 2 Membranen. Filtriert wurde unter Stickstoffdruck bei 3 kp/cm² in einer mit einem Magnetrührer ausgestatteten Filtrierzelle. Die Filtrierzelle war mit einem Vorratsgefäß verbunden. Nach dem Einkonzentrieren der Probe in der Filtrierzelle auf 100 ml wurde sie entnommen und gefriergetrocknet.

3.4.2. Bestimmung des Gesamtaminosäuregehalts

1 mg Tagessammelprobe wurde in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. 0,1 ml der Probe wurden mit 2 ml 2,5 N NaOH versetzt und 2,5 Stunden bei 95° C im Wasserbad hydrolysiert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 2 ml 30 prozentiger Essigsäure und 1 ml Ninhydrin-Reagenz. Anschließend wurde die Probe bei 570 nm im PMQ II Zeiss Photometer gegen den Reagenzienleerwert gemessen und der Gesamtaminosäuregehalt über eine Isoleucin-Eichkurve bestimmt.

3.4.3. Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts (32)

1 mg Tagessammelprobe wurde in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und 0,1 mg TSP/0,1 ml dest. Wasser entnommen. Die auf 0° C gekühlte Probe wurde mit 5 ml Anthronreagenz unterschichtet, geschüttelt und für fünf Minuten gekühlt bei 0° C.
Danach wurde die Probe im Wasserbad für 10 Minuten bei 100° C erhitzt, anschließend abgekühlt.
Die Probe wurde dann im PMQ II Zeiss Photometer bei 625 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen und der Gesamtkohlenhydratgehalt über eine Glucose-Eichkurve bestimmt.

3.4.4. Durchführung der sauren Hydrolyse und Aufarbeitung des Hydrolysats

10 mg Tagessammelprobe oder die entsprechende Menge Modellsubstanzen (siehe Abschnitt 2.4.) wurden in eine Hydrolyse-

ampulle überführt. Nach Zugabe von 5 ml 6N HCl wurde der Inhalt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde die Ampulle unter Vakuum zugeschmolzen und im Trockenschrank bei 110° C für 24 Stunden erhitzt. Nach Abzentrifugieren der während der Hydrolyse gebildeten und ausgefallenen unlöslichen Materialien wurde das Hydrolysat am Rotationsverdampfer bei 40° C bis zur Trockne eingedampft. Zur Entfernung der Salzsäure wurde der Rückstand dreimal in 2 ml destilliertem Wasser aufgenommen und jeweils wieder bis zur Trockne eingedampft. Das Hydrolysat wurde anschliessend in 1 bis 2 ml Citratpuffer pH 3,2 aufgenommen und die zur Analyse benötigten Probenkonzentrationen über eine Verdünnungsreihe eingestellt.

3.4.5. Hydrolyse der Kohlenhydrate

Zur Hydrolyse wurde Trifluoressigsäure verwendet. Sie bewirkt keine oder geringe Verluste von Zuckern (33).

2 mg Tagessammelprobe wurden mit 2 ml 1,8N Trifluoressigsäure in eine Hydrolyseampulle überführt. Der Inhalt wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend die Ampulle unter Vakuum zugeschmolzen. Die Hydrolyse wurde für 8 Stunden bei 110° C im Trockenschrank durchgeführt. Danach wurde das Hydrolysat im Rotationsverdampfer bei 40° C bis zur Trockne eingedampft und in 1 ml 9,4 m Boratpuffer pH 9,3 zur Analyse im Zuckeranalysator aufgenommen*.

* Für die Durchführung der Zuckeranalyse danke ich Herrn Dr. H. Bauer

3.5. Isolierung der ninhydrinpositiven Substanzen am Kationenaustauscher

3.5.1. Aufbau des Chromatographen

Die Trennung der Hydrolysate sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab erfolgt an einem umgebauten "Unichrom-Aminosäureanalysator" der Firma "Beckman-Instruments", München (34). Dieser ist mit einem Durchflußphotometer der Schichtdicke 2,2 mm und einem Philipps-Schreiber PR 4380 M ausgerüstet.
Das Fließschema gleicht im wesentlichen dem des ursprünglichen Gerätes. Statt der für die Aminosäureanalyse üblichen Natriumcitrat-Puffer wird als Elutionsmittel ein Pyridinacetat-Gradient verwendet. Die Herstellung aus seinen Komponenten erfolgt in einem Mischer aus Plexiglas nach C.W.Parr (35) oder E.A. Peterson und H.A. Sober (36).

Der Pufferdurchfluß beträgt 60 ml/h und erzeugt einen Arbeitsdruck zwischen 18-30 atm.

Die Verbindung mit dem Säulenkopf erfolgt über eine Probenaufgabeventil mit Probenschleife.

Die Abmessungen der Säule betragen 60 x 0,9 cm. Das Säulenfüllmaterial besteht aus einem stark sauren Kationenaustauscher mit Sulfonsäure-Austauschgruppen an einem Polystyrolharz mit einem Vernetzungsgrad von 7% und einer Korngröße von 15-20 µm (Kationenaustauscher M 72, Beckman-Instruments, München).

Die Temperatur des Säulenmantels beträgt 58° C.

3.5.2. Durchführung der Trennungen

3.5.2.1. Puffer und Standardlösungen

Puffer 1:	16,2 ml	(0,2 Mol) Pyridin	
	557 ml	Essigsäure	= 2L pH 2,82
		Wasser	
Puffer 2:	16,2 ml	(0,2 Mol) Pyridin	
	240 ml	Essigsäure	= 2L pH 3,28
		Wasser	
Puffer 3:	324 ml	(4,0 Mol) Pyridin	= 2L pH 5,05
	573 ml	Essigsäure	
		Wasser	

Aminosäurestandardlösung:

Eine 1 mM Lösung wurde durch Einwiegen der Standardaminosäuren und Cysteinsäure hergestellt und mit Puffer 1 auf 100 ml aufgefüllt.

3.5.2.2. Säulenvorbereitung

Der Ionenaustauscher wird gemäß der Beckman-Vorschrift gereinigt (37) und anschließend bis zur neutralen Reaktion mit destilliertem Wasser gewaschen.
Danach wird der Austauscher dreimal für 15 Minuten in 2N HCl aufgenommen und wieder neutral gewaschen.
Das Harz wird dann in Pyridin aufgenommen. Nach Absaugen des Pyridins durch die Fritte wird das Harz dreimal für 10 Minuten in 0,1 M Pyridinacetat-Puffer gerührt.
Anschließend wird es mit zwei Drittel des Harzvolumens an Puffer 1 aufgerührt. Mit diesem Gemisch wird die Säule gefüllt.
Der Pufferdurchfluß beträgt 60 ml/h. Diese relativ geringe Geschwindigkeit ist notwendig, da die Hydrolysate rasch

das Säulenmaterial verstopfen und den Säulendruck ansteigen lassen. Steigende Ionenstärke und zunehmender pH-Wert des Puffergradienten bewirken durch Zusammenpressen des Säulenmaterials einen zusätzlichen Druckanstieg. Ist dieser erst einmal über 28-30 atm. gestiegen, wird die Säule geleert und neu gefüllt.

Nach jeder Trennung wird für zwei Stunden Puffer 3 durch die Säule gepumpt, um noch nicht eluierte Aminosäuren und andere ninhydrinpositive Substanzen zu entfernen. Dann wird die Säule wieder für zwei Stunden mit Puffer 1 äquilibriert.

3.5.2.3. Probenvorbereitung

Die Tagessammelproben enthalten vor und nach der Hydrolyse beträchtliche Anteile höher- und niedermolekularer grünlich-bräunlicher Substanzen.
Diese führen bei der präparativen Isolierung rasch zur Verstopfung des Harzes und zum schnellen Anstieg des Säulendrucks. Kleine Anteile werden noch nach 6 und 7 Stunden eluiert und verleihen den isolierten Substanzen eine grünliche Färbung.
Um dies weitgehend zu vermindern, wurde das Hydrolysat vor der präparativen Isolierung nochmals nach vorheriger Neutralisierung mit Natriumhydrogencarbonat über eine kleine UM 2 Membran filtriert. Die restlose Abtrennung der ninhydrinpositiven Substanzen vom höhermolekularen Überstand wurde durch Ninhydrin-Färbung weniger µl des Filtrats auf Kieselgel gesichert. Geringe Anteile grünlich-bräunlicher Substanzen waren aber auch stets im Filtrat vorhanden.

Zur präparativen Trennung wurden 200 mg TSP hydrolysiert, über die UM 2 Membran vorgereinigt, das Filtrat im Rotationsverdampfer eingeengt und in 4 ml Puffer 1 aufgenommen.

3.5.2.4. Analytische Trennung

0,1 ml Probenlösung (enthält 10 µMol Cysteinsäure als Standardaminosäure) werden auf die Säule aufgetragen. Mit einem Gradienten aus je 200 ml Puffer 1 und 2 sowie 400 ml Puffer 3 wird eluiert, mit Stein-Moore-Reagenz versetzt und die Extinktion mit einem Schreiber registriert.
Das Chromatogramm einer Aminosäurestandard-Lösung zeigt, daß Arginin als letzte Aminosäure nach ungefähr 9 Stunden eluiert wird.

Der Vergleich der Chromatogramme von Aminosäurestandard und TSP Hydrolysat zeigt die Lage der gesuchten ninhydrinpositiven Substanzen an.

3.5.2.5. Präparative Trennung

Hierzu wird der Säulenkopf herausgenommen und das in 4 ml Puffer 1 aufgenommene Hydrolysat direkt in die Säule eingebracht. Die Säule wird dann mit einem Druckventil verschlossen und das Hydrolysat mit 3 kp/cm² in das Harz gepresst. Zur Entfernung von Hydrolysatresten über dem Säulenmaterial wird der gleiche Vorgang zweimal mit je 2 ml Puffer 1 wiederholt. Es ist darauf zu achten, daß keine Luft in das Harz gelangt. Anschließend wird wieder der Säulenkopf aufgesetzt und unter den gleichen Bedingungen wie der analytischen Trennung eluiert.

Die die unbekannten Substanzen enthaltenden Fraktionen findet man, indem man die Zeitspanne Einspritzpeak-Ninhydrinpeakmaximum zuzüglich der Zeitspanne Säulenende-Fraktionssammler vom Cysteinsäuremaximum beim analytischen Lauf abzieht. Damit ist der Nullpunkt für den Beginn der präparativen Trennung festgelegt. Ab hier werden die Zeitspannen bis zum Beginn der unbekannten Peaks berechnet und dann die entsprechenden Fraktionen entnommen. Da sich die Lage der Peaks immer etwas verschiebt, wird sie genau durch Ninhydrin-Färbung weniger µl der entnommenen Fraktionen auf Kieselgel gesichert.

Die enstprechenden Fraktionen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingeengt, zweimal in Wasser aufgenommen und jeweils wiederum eingedampft.

Die Substanzen werden anschließend zur vollständigen Entfernung von Pyridinacetat-Puffer zweimal lyophylisiert.

3.6. Zur Klassifizierung der isolierten Substanzen

Zur ersten Einordnung nach Substanzklasse und reaktiven Gruppen wurden die isolierten Substanzen mit den unten angegebenen Merck-Reagenzien besprüht (38). Hierzu wurden wenige µl der Substanzen auf Kieselgelplatten aufgebracht, nach Vorschrift besprüht und behandelt.

Tab. 19:

Stoffklasse oder reaktive Gruppe	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	verwendetes Sprühreagenz Merck Nr.
NH_2 Gruppe	+	+	+	+	+	+	+	Ninhydrinreagenz s. 3.3.
	-	-	+	+	+	+	+	Dimethylaminobenzaldehyd Merck Nr. 88
freie Aldehyd- und Ketogruppe	Aldehydverbindungen ohne C=C-Doppelbindungen	-	-	-	-	-	-	2,4 Dinitrophenylhydrazin Reagenz Merck Nr. 103
allg. org. Säuren u. Ketosäuren	+	-	-	-	-	-	-	2,6-Dichlorphenol-Indophenol-Natrium Merck Nr. 82
N-haltige Heterocyclen	-	-	-	-	-	-	-	4-Methylumbelliferon Merck Nr. 202
Aminozucker	-	-	+	+	(+)	-	-	4-Dimethylaminobenzaldehyd Acetylaceton Merck Nr. 89

3.7. Derivatisierung und Gaschromatographie der ninhydrinpositiven Substanzen S 1 bis S5

3.7.1. Derivatisierung von S 1

Die Substanz wird in 1 ml 1,5 N HCl in Methanol aufgenommen. Die Reaktionszeit beträgt 60 Minuten bei 110° C. Anschließend wird das Reagenz mit N_2 abgeblasen. Zur Aufnahme der Gaschromatogramme wird die derivatisierte Substanz in 10-20 µl Methylenchlorid abs. aufgenommen. Analog wird Lävulinsäure derivatisiert.

3.7.2. Derivatisierung von S 2, Uron- und Onsäuren

Die Substanz wird in 0,5 ml Methoxylamin-HCl (16 mg Methoxylamin-HCl/ml Pyridin) aufgenommen. Die Reaktionszeit beträgt drei Stunden bei 70° C. Nach Abblasen des Pyridins über Stickstoff werden 100 µl N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid zugegeben. Die Reaktionszeit beträgt 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Lösung wird direkt zur Einspritzung verwendet (39). Glucuronsäure, Galacturonsäure, Glucon- und Galactonsäure werden zur Bestimmung der Kovats-Retentionsindices ebenso derivatisiert.

3.7.3. Derivatisierung von S 3, S 4 und S 5

Die Substanzen ließen sich alle mit Trifluoracetanhydrid derivatisieren (40). Die jeweilige Substanz wird in 30 µl Methylenchlorid, 15 µl Trifluoracetanhydrid und 5 µl Pyridin aufgenommen. Die Reaktionszeit beträgt drei Stunden bei Raumtemperatur. Die Substanzen werden mit dem Derivatisierungsreagenz eingespritzt.

3.7.4. Derivatisierung von Glucosamin und Galactosamin

Zur Vergleichszwecken werden jeweils 500 µg der Aminozucker wie unter 3.7.3. angegeben derivatisiert.

3.7.5. Derivatisierung von Verunreinigungen aus Säulenmaterial

Bei der präparativen Isolierung wurden nach Auffangen der substanzhaltigen Fraktionen noch zusätzliche Fraktionen gesammelt und wie unter 3.5. aufgearbeitet. Um Fehlinterpretationen bei der Auswertung von Gaschromatogrammen substanzhaltiger Fraktionen zu vermeiden, wurden diese ebenfalls wie unter 3.7.1. - 3.7.4. derivatisiert.

3.7.6. Gaschromatographie

Zur Durchführung der Versuche wurde ein Gaschromatograph von Carlo Erba Modell Fractovap 2101 verwendet.
Arbeitsbedingungen: Trägergas
Stickstoff: 0,1 kg/cm²
Wasserstoff: 0,3 kg/cm²
Sauerstoff: 0,6 kg/cm²
Papiervorschub: 30 cm/h

Zur Aufnahme der Gaschromatogramme von S 1 und Läuvlinsäuremethylester wurde eine leicht saure OV 101 Glaskapillarsäule (Länge 10 m, i.D. 0,25 mm) verwendet. Temperaturprogramm 4° C/min, 50° - 100° C.

Gaschromatogramme von S 1 und S 2 als Methoxylamin/Trimethylsilyl-Derivate wurden an einer wie oben beschriebenen OV 101 Glaskapillarsäure aufgenommen. Temperaturprogramm 8° C/min, 60° - 220° C.

Zur Aufnahme der Gaschromatogramme von S 3, S 4, S 5, Glucosamin und Galactosamin als trifluoracetylierte Derivate wurde eine leicht saure OV 1 Glaskapillarsäule verwendet. Temperaturprogramm 8° C/min, 60° - 150° C. Für S 5 wurde ein Temperaturprogramm von 60° - 220° C, bei 8° C/min gewählt.

Die Bestimmung der Kovats-Retentionsindices von S 2 und den Uron- bzw. Onsäuren erfolgte an einem Gaschromatographen von Carlo Erba Modell Fractovap G 1.

Arbeitsbedingungen: s.o.

Säule	: OV 101 Glaskapillarsäule
Temperatur	: 170° C isotherm
Papiervorschub	: 0,8 cm/min

Zur Berechnung des Kovats-Index wurde die jweilige mit Methoxylaminhydrochlorid und N,N-bis-Trimethylsilyl-trifluoracetamid derivatisierte Substanz (s. 3.7.2.) zusammen mit den n-Alkanen C_{18}, C_{20} und C_{22} eingespritzt.

3.8. Derivatisierung von S 6, S 7 und Aminen

50 µg S 6 und S 7 werden in 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen, mit 20 µl Merck-Puffer pH 9,0 versetzt und 50 µl ($5 \cdot 10^{-7}$ Mol) Dansylchlorid in reinem, wasserfreiem Aceton (27 mg/10 ml) dazugegeben. Die Reaktionszeit beträgt eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wird im Vakuum bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand zur Dünnschichtchromatographie in 30 µl Aceton aufgenommen (41).

$5 \cdot 10^{-8}$ Mol Methylamin-HCl, Dimethylamin-HCl und Äthanolamin-HCl als Vergleichssubstanzen werden ebenso derivatisiert.

Unter der UV-Lampe (365 nm Hg-Linie) fluoreszieren die DANS-Amide gelbgrün, während die Amine, die auch mit einer phenolischen OH-Gruppe reagiert haben (z.B. Adrenalin, Dopamin) eine intensive gelbe oder eine gelb-orange Fluoreszenz zeigen (30). Aminosäuren werden an ihrer intensiv gelben Fluoreszenz erkannt (42).

4. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Identifizierung ninhydrinpositiver Substanzen aus Abwasser. Dazu wurden aus dem Zulauf der Kläranlage Eutingen/Horb Tagessammelproben entnommen und entsprechend aufgearbeitet.

Die ultrafiltrierten Tagessammelproben stellten im wesentlichen ein Substanzgemisch aus Proteinen, Peptiden, Kohlenhydraten, Lipiden und Huminanteilen dar. Es bestand daher die Vermutung, daß während der sauren Hydrolyse Reaktionen zwischen diesen Stoffklassen - insbesondere zwischen Proteinen und Kohlenhydraten - stattfinden, die eventuell zum Auftreten einiger der bisher nicht näher identifizierten Substanzen im Aminosäureanalysator führen können.

Modellhydrolysen mit den in der Tagessammelprobe aufgefundenen Zuckern und Rinderserumalbumin zeigten, daß hierbei zwischen Einspritzpeak und Asparaginsäure im Aminosäureanalysator drei Substanzen auftreten.
Modellhydrolysen von Zuckergemischen mit den in der Tagessammelprobe bestimmten Zuckern ohne Rinderserumalbumin erwiesen, daß zwei dieser Substanzen Zuckerabbauprodukt sind. Der zuerst für eine Substanz gehaltene Peak SO (siehe Abb. 8) stellt lediglich eine unspezifische Reaktion höhermolekularer Anteile der Hydrolysate mit Ninhydrin dar.

Mit verschiedenen Untersuchungsverfahren (Sprühreagenzien, DC, UV, IR, GC/MS) konnte der größte Teil der ninhydrinpositiven Substanzen einwandrei identifiziert werden.
Es handelt sich bei diesen Substanzen um Lävulinsäure (S 1) als Zuckerabbauprodukt , Glucosamin (S 3), Galactosamin (S 4), Äthanolamin (S 6) und Dimethylamin (S 7). Sie sind bereits von der Aminosäureanalyse biologischer Materialien her bekannt. Äthanolamin ist ein Bestandteil zahlreicher Lipide.

Substanz S 2 ist nach der GC/MS-Analyse und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Modellhydrolysen ein Zuckerabbauprodukt. Eine genaue Identifizierung war nicht möglich.

Substanz S 5 enthält nach Auswertung des UV-Spektrums und der Massenspektren offensichtlich einen aromatischen Anteil. Dieser ist möglicherweise an einen Aminozuckerrest gebunden. Das Molekulargewicht liegt im Bereich von 270.
Da die isolierte Substanz in außerordentlich geringer Menge vorlag (ca. 0,5 mg), waren weitere Untersuchungen zur Strukturaufklärung (NMR, IR, Elementaranalyse, Molekulargewichtsbestimmung) ausgeschlossen. Die Substanz könnte bei der sauren Hydrolyse aus Huminanteilen freigesetzt worden sein.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1) G. Scheer: Untersuchungen zur Entstehung von Blähschlamm, Dissertation, Tübingen 1975.
2) M. Krutz in: Veröffentlichungen des Instituts für Wasserforschung und der hydrologischen Abteilung der Stadtwerke AG, Dortmund 1975.
3) W. Bergmann, unveröffentlicht, Tübingen 1977.
4) R.M. Zacharius, E.A. Talley, J.Chromatog. 7, 51 (1962).
5) S.U. Khan, F.J. Sowden, Can.J.Soil Sci. 51, 185 (1971).
6) O. Hadzija, D.Keglevic, J.Chromatog. 138, 458 (1977).
7) R.M. Zacharius, E.A. Talley, Anal.Chem. 34, 1551 (1962).
8) E. Schram, J.P. Dustin, S. Moore, E.J.Bigwood, Anal.Chim.Acta 9, 149 (1953).
9) E.D. Schilling, P.J. Burchill, I.R. Coffman, R.A. Clayton, Biochem.Biophys.Res.Commun. 5, 217 (1961).
10) E.D. Schilling, P.J.Burchill, R.A. Clayton, Anal.Biochem. 5, 1 (1963).
11) R.M. Zacharius, W.L. Porter, J.Chromatog. 30, 190 (1967).
12) A.C. Olson, L.M. White, A.T. Noma, J.Chromatog. 43, 399 (1969).
13) D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore, Anal.Chem. 30, 1190 (1958).
14) A. Gottschalk, Glykoproteins (Bd. 1), Amsterdam 1972, p.141.
15) L.C. Maillard, Compt.Rend. 66, 154 (1912 a)
16) A.Gottschalk, Glykoproteins (Bd. 1), Amsterdam 1972, p. 144.
17) I.E. Hodge, C.E. Rist, J.Am.Chem.Soc. 75, 316 (1953).
18) W. Pigman, D. Horton, The carbohydrates (Bd. Ia), New York 1972, p. 181.
19) P.E. Shaw, J.H. Tatum, R.E. Berry, Carbohydrate Res. 5, 266 (1967).
20) K. Heyns, J. Henkeshoven, K.H. Brose, Angew.Chem. 80, 627 (1968).

21) A. Gottschalk, Biochem.J. 52, 455 (1952).
22) J.Anet, Australian J.Chem. 12. 280 (1959 a).
23) A. Schönberg, R. Moubacher, Chem.Rev. 50, 261 (1952)
24) K. Heyns, W. Stumme, Chem.Ber. 89, 2833 u. 2844 (1956).
25) A. Mohammed, H. Fraenke.Conrat, H.S. Olcott, Arch.Biochem. 24, 157, 270 (1949 a u. b).
26) H.S. Burton, D.I. Mc Weeny, D.O.Biltcliffe, Chem.Ind. 219, 1682, Londin 1962 b.
27) D.C. DeJongh, T. Radford, I.D. Hribar, S. Hannessian, M. Bieber, G. Dawson, C.C. Sweeley, J.Am.Chem.Soc. 917, 1729 (1969).
28) E. Merck, Präparate für die GC, Darmstadt 1976.
29) K. Lübke, E. Schröder, G. Kloss, Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine II, Stuttgart 1975, S. 180.
30) N. Seiler, M. Wiechmann, Exper. 21, 203 (1965).
31) D.H. Spackmann, W.H. Stein, S. Moore, Anal.Chem. 30, 1190 (1958).
32) D. Herbert, P.I. Phipps, R.E. Strange, in: Methods in Microbiology, Vol. 5B, London 1971, p. 265.
33) H. Bauer, unveröffentlicht.
34) H. Frank, Dissertation, Tübingen 1973.
35) W. Parr, Proc.Biochem.Soc., 324th meeting XXVII
36) E.A. Peterson, H.A. Sober, Anal.Chem. 31, 857 (1959).
37) Beckman Instruments, Bedienungsanleitung für Aminosäure-analysator Multichrom B, München 1973.
38) E. Merck, Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Darmstadt 1970.
39) J.C. L'huguenot, B.F. Maume, C. Baron, Chromatographia 4, 204 (1971).
40) W.A. König. H. Bauer, W. Voelter, E. Bayer, Chem.Ber. 106, 1905 (1973).
41) B. Kaltenegger, Diplomarbeit, Tübingen 1975.
42) N. Seiler, J. Wiechmann, Exper. 20, 559 (1964).

LEBENSLAUF

Am 19. Oktober 1946 wurde ich als Sohn des Textilkaufmanns Siegfried Bimboes und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Herrgesell, in Holzminden/Weser geboren.

1953 zogen wir nach Berlin, wo ich die Grundschule und anschließend die Mittelschule besuchte.

1962 siedelten wir nach Reutlingen über. An der Mittelschule bestand ich im März 1963 die Mittlere Reife.

Im Juli 1967 bestand ich das Abitur am Johannes-Kepler-Gymnasium in Reutlingen.

Von Oktober 1967 bis Juli 1968 leistete ich den Wehrdienst.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich mit dem Studium der Biologie an der Universität Tübingen, wo ich im April 1971 die Diplom-Vorprüfung ablegte. Im Februar 1973 legte ich die mündliche Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Organische Chemie, Biochemie und Pharmakologie ab. Vom August 1973 bis November 1974 führte ich unter Anleitung von Herrn Dozent Dr. H. Greim am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen die experimentelle Diplomarbeit durch. Unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Bayer erstellte ich die vorliegende Doktorarbeit in der Zeit von Oktober 1975 bis November 1977.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

E. Bayer, E. Bünning. H. Greim, K. Grell, W. Löffler, E. Müller, H. Remmer, A. Rieker, W. Schweizer, H. Seiler, H. Stegmann, G. Weitzel, H. Zähner, K. Zetsche.

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321